

Untersuchungen über den Vitamin C-Gehalt von
Nebennieren nach Thyreoidektomie und bei
Vitamin A-Mangel unter besonderer
Berücksichtigung der analytischen
Feststellung.

Otto Käppeler

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Joh. Brüggemann

Untersuchungen über den Vitamin C-Gehalt von Nebennieren
nach Thyreoidektomie und bei Vitamin A-Mangel unter besonderer
Berücksichtigung der analytischen Feststellung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von
Otto Käppeler
Veterinärpraktikant
aus
Hundersingen, Wttbg.

München 1957

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. Liebmann

Referent: Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann

Tag der Promotion: 24. Juli 1957

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
I. Einleitung	1
II. Literatur	2
1. Das regulative Verhalten der Nebennierenrinde im Organismus	2
2. Die Ascorbinsäurekonzentration der Nebenniere und ihre Dynamik	5
3. Die biochemische Bedeutung der Ascorbinsäure in der Nebenniere	11
4. Beziehungen zwischen Schilddrüse und Nebennierenrinde	13
5. Vitamin-A-Mangel und seine Beziehung zur Nebennierenrinde	16
III. Versuche zur Methodik der Ascorbinsäurebestimmung in Nebennieren	18
1. Histologischer Nachweis	18
2. Chemische Bestimmung	19
a) Die chemischen Grundlagen des kalorimetrischen Verfahrens mit Dinitrophenylhydrazin	19
b) Untersuchungen über die Spezifität des "Celite"-Verfahrens	20
c) Das modifizierte "Celite"-Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von Ascorbinsäure und Adrenalin in Nebennieren	27
d) Das vereinfachte "Kohle"-Verfahren; Untersuchungen über die Fehlermöglichkeiten beim Einsatz der Kohle	30
IV. Tierversuche	36
1. Versuchsmaterial und Versuchsanordnung	36
2. Ergebnisse der Tierversuche	39

V. Diskussion	50
1. Besprechung der Versuche zur chemischen Bestimmung der Ascorbinsäure in Nebennieren	50
2. Besprechung der Ergebnisse der Tierversuche	52
VI. Zusammenfassung	55
VII. Literaturverzeichnis	57
Lebenslauf	63

I. Einleitung

Im Rahmen vom im Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München ausgeführten Untersuchungen über Fragen der Beeinflussung des Resorptionsumfanges (am Beispiel des S^{32}) durch Ausfallserscheinungen im Endokrinium und bei Vitaminmangelzuständen wurden Rattenversuche an thyreoidektomierten und A-avitaminotischen Tieren durchgeführt. Da besonders die Funktion der Nebennierenrinde auch für Resorptionsvorgänge (Phosphorylierungen usw.) von Bedeutung ist, bei Ausfallserscheinungen in der Schilddrüse und der Vitaminversorgung aber Rückwirkungen auf die Nebennierenrindenfunktion anzunehmen sind, ergab sich die Fragestellung, in wie weit sich bei den genannten Rattenversuchen Unterschiede im Verhalten der Nebennieren nachweisen ließen.

Es wurde mir deshalb die Aufgabe gestellt, am vorliegenden Versuchstiermaterial und an Hand der Literatur Korrelationen zwischen Nebennierenrinde und Vitamin A-Mangel bzw. Schilddrüsenausfall zu prüfen. Als Kriterium für die Nebennierenrindenaktivität sollten die Drüsengewichte sowie deren Vitamin C-Gehalte dienen. Der Vitamin C-Gehalt der Nebennieren und die Bestimmungsmethoden dazu sollten dabei eingehend untersucht werden.

II. Literatur

1. Das regulative Verhalten der Nebennierenrinde im Organismus.

Die lebenswichtige Funktion der Nebennierenrinde (NNR) ist schon lange bekannt. Auf Grund der Befunde von B i e d l (5), W h e e l e r und V i n c e n t (105), H o u s s a y und L e w i s (43), W i s l o c k i und C r o w e (106), Z w e m e r (110) sowie S w i n g l e (93) war man zu der Überzeugung gelangt, daß nach Adrenalektomie der Tod durch den Mangel an Rindenhormon eintritt und nicht durch das Fehlen des Nebennierenmarkes (NNM) bzw. seines Produktes, des Adrenalins, das sich zur Verlängerung des Lebens als völlig wirkungslos erwiesen hatte.

1928 wurde zum erstenmal von H a r t m a n n und Mitarbeiter (36) die Mitteilung gemacht, daß man durch wässrigen Extrakt aus der NNR adrenalektomierte Katzen längere Zeit am Leben erhalten könne.

Die Entdeckung der Hormone der NNR ist S w i n g l e und P f i f f n e r (94) zu verdanken, die 1931 in 3 wichtigen Arbeiten die Darstellung wirksamer NNR-Extrakte eingehend beschrieben und damit der chemischen Forschung den Weg wiesen. In drei verschiedenen Laboratorien wurden gleichzeitig Versuche über die Analyse der Struktur der Rindenhormone und ihre Synthese gemacht, nämlich durch K e n d a l l in Rochester, R e i c h s t e i n in Zürich und W i n t e r s t e i n in New-York. Die durch uneinheitliche Nomenklatur etwas verwirrenden Ergebnisse wurden von A b d e r h a l d e n (2) übersichtlich zusammengestellt.

Die Regulation im Endokrinium, die zu einer Ausschüttung der NNR-Hormone führt, ist hinreichend erforscht worden. S m i t h (87) wies 1926 nach, daß die Hypophyse eine regulative Kontrolle auf die NNR ausübt. In seinem "klassischen" Experiment demonstriert er, daß die Exstirpation der Hypophyse eine Atrophie der NNR bewirkt. Es erwies sich bald, daß zellfreie Hypophysenextrakte (E v a n s (21), H o u s s a y und Mitarbeiter (42)) und gereinigte Eiweißpräparationen von Hypophysengewebe (C o l l i p, A n d e r s o n und T h o m s o n (15)) eine stimulierende Wirkung auf die NNR von hypophysenektomierten Tieren haben.

1943 isolierten L i, E v a n s und S i m p s o n (53) aus Hypophysen von Schafen und S a y e r s, W h i t e und L o n g (79) aus den von Schweinen ein Protein-Hormon, adrenocorticotropes Hormon (ACTH), das sich

als eine homogene Substanz erwies und speziell die NNR stimulierte.

Durch die Möglichkeit bei den weiteren Versuchen reines ACTH verwenden zu können, wurde es bald klar, daß alle chemischen und morphologischen Veränderungen in der NNR, die sich bei Tieren nach unspezifischen äußeren und innerlichen Belastungen einstellen, durch die Verabreichung dieser adenotropen Substanz spezifisch reproduziert werden können. So verursacht z.B. die Verabreichung von ACTH ebenso eine Vergrößerung der NNR (S a y e r s und Mitarbeiter (76)) wie schädliche Stimulantien (S a y e r s u.a. (75), T r e p p e r m a n n, E n g e l und L o n g (96)).

S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) machen die Feststellung, daß nach Exstirpation der Hypophyse die Nebennieren (NN) von Ratten durch keinerlei Stress mehr beeinflußt werden können. L o n g (55) schließt daraus, daß ausschließlich die Hypophyse einen regulativen Einfluß auf die Ausschüttung der Rindenhormone hat, während nervöse Reize keinen direkten Angriffspunkt an der NNR haben.

Für den engeren Mechanismus dieser beiden endokrinen Drüsen wird eine Selbstregulation des ACTH- und Corticoidblutspiegels angenommen. Einen Beweis dafür liefert die Mitteilung von S a y e r s und S a y e r s (74), daß die bei Ratten übliche Ausschüttung von ACTH nach einem Kältestress ausbleibt, wenn dem Tier vor dem Versuch NNR-Extrakte verabreicht werden. Die Autoren vermuten, daß diese Hormone nicht indirekt über den Stoffwechsel, sondern direkt auf die Hypophyse wirken, da Corticosteron und Desoxycorticosteron sich in ihrer Wirkung auf den Stoffwechsel beträchtlich unterscheiden und trotzdem auf die Hypophyse annähernd die gleiche Hemmungswirkung ausüben.

Nach S e l y e und H o r a v a (85) scheint diese Selbstregulation jedoch nur innerhalb physiologischer Grenzen zu stimmen, während bei Dauerbelastung die ACTH-Ausschüttung völlig unabhängig von dem Corticoidblutspiegel ist.

Die Vermutung von S e l y e und J e n s e n (86), daß es 4 verschiedene corticotrope Hormone gibt, konnte bis jetzt von anderen Forschern nicht bestätigt werden. Ebenso ist die Mitteilung von C h e s t e r (12), nach dem die 3 Zonen der NNR von ganz spezifischen Hormonen des HVL beeinflußt werden, sehr umstritten.

Nach neueren Untersuchungen ist in diesem Regulationsmechanismus zwischen NN und Hypophyse auch der Hypothalamus, der ja durch eine Gewebsbrücke, den Hypophysenstiel, mit der Hypophyse in Verbindung steht, als eine Zwischenschaltstelle zu betrachten. B r o l i n (9) und C h e n S a y e r s, G o o d m a n und S w i n y a r d (11) berichten zwar, daß nach Durchtrennung des Hypophysenstiels die typische ACTH-Sekretion bei akuten und auch chronischen Belastungen erhalten bleibt, und F o r t i e r und S e l y e (24) beweisen wohl, daß in die vordere Augenkammer transplantiertes HVL-Gewebe mit nachweisbarer ACTH-Sekretion auf Kälte und traumatische Einwirkungen reagiert; aber beide Versuche sind nur ein Beweis dafür, daß die Hypophyse nicht auf nervösem, sondern nur auf humoralem Wege beeinflußt werden kann. Dagegen beweisen sie keineswegs, daß der Wirkstoff dieser humoralen Wirkung nicht trotzdem aus dem Hypothalamus stammt.

Dieser Frage geht S c h r e i b e r (82) nach, der den Hypothalamus von Kaninchen in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und diese Suspension Ratten injiziert. Nach einer einmaligen Injektion sinkt der Ascorbinsäuregehalt der NN gegenüber dem von Kontrolltieren, die nur mit reiner Kochsalzlösung geimpft wurden. Bei wiederholten Injektionen hypertrophieren die NN, und der ACTH- und Gonadotropingehalt in der Hypophyse sinkt.

Daß über diese Fragen die Versuche jedoch noch längst nicht abgeschlossen sind, zeigen die Berichte von D e G r o o t und H a r r i s (34). Nach ihnen löst die Reizung des Tuber cinereum und Corpus mamillare des Hypothalamus eine lymphopenische Reaktion, ein typisches Zeichen gesteigerter Rindenaktivität, aus, die bei Reizung rostraler Gebiete des Hypothalamus nicht ausgelöst werden konnte. Auch E n d r ö c z i und M e s s (19) griffen die Frage der nervösen Beeinflußbarkeit des HVL wieder auf. Läsionen der rostralen Kerngruppen des Hypothalamus blockieren nach ihren Versuchen das NN-Hypophysen-System nicht. Dagegen haben Läsionen der kaudalen Kerngruppen zur Folge, daß der Ascorbinsäurespiegel der NN nach akuten Belastungen nicht mehr abfällt, obwohl die NN dieser Tiere nicht atrophieren. Der bei normalen Tieren kompensatorische Sturz der Ascorbinsäurekonzentration nach einseitiger Adrenalectomie bleibt bei diesen Versuchstieren ebenfalls aus. Die Verfasser nehmen daher eine neuro-hormonale Steuerung der Hypophyse an. Ferner vermuten sie, daß die Hypophyse auch ohne jede regulierende Steuerung vom Hypothalamus

konstant eine geringe Menge ACTH ausschüttet, was die Gewichtskonstanz der NN trotz Hypothalamusläsion erklären könnte.

Nach neuesten Mitteilungen prüften T o n u t t i und Mitarbeiter (80) die Frage der hypothalamischen Steuerung der ACTH-Abgabe aus der Hypophyse an Meerschweinchen mit Hypothalamusläsionen im Diphterietoxinversuch. Verschiedene Hypothalamusbereiche wurden durch Elektroagulation bilateral zerstört. Als Indikator einer regulären bzw. gehemmten ACTH-Abgabe diente das Auftreten bzw. Ausbleiben der hämorrhagischen Nekrosen der NNR nach Diphterietoxinvergiftung. Es zeigte sich, daß die Zerstörung der Nuclei hypothalamici ventromed. und dorsomed. ein vollständiges Ausbleiben der nach Diphterietoxin zu erwartenden hämorrhagischen Nekrosen zur Folge hatte. Daraus ergibt sich, daß die beiden genannten Kernbezirke von entscheidender Bedeutung für die Regulation der ACTH-Mobilisierung im Rahmen der Diphterietoxinvergiftung sind.

2. Die Ascorbinsäurekonzentration der Nebenniere und ihre Dynamik.

Die Ascorbinsäure ist ein Bestandteil aller Gewebe mit regem Stoffwechsel. In besonders großen Mengen ist sie in der NNR vorhanden, in der sie 1928 von S z e n t - G y ö r g y i (95) erstmals gefunden und kristallin dargestellt wurde. H u s z á k (44) fand 1933 auch im NNM die Ascorbinsäure in ähnlichen Konzentrationen, während G l i c k und B i s k i n d (33) 1935 feststellten, daß die Zona fasciculata, der am stärksten funktionierende Teil der Rinde, sie am meisten enthielt.

Schließlich berichtete G i r o u d (31) 1938, daß bei den meisten Tieren das NNM 94 mg%, die NNR aber 149 mg% Ascorbinsäure enthalte. Dieser besondere Reichtum der NNR an Ascorbinsäure war der Ausgangspunkt für alle Vermutungen über einen Zusammenhang des Vitamins C mit der bekannten hormonellen Funktion dieses Gewebes.

Es ist bekannt, daß bei Belastungen des Stoffwechsels der Organismus einen erhöhten Bedarf an NNR-Hormonen hat, so daß es über die Hypophyse nach dem geschilderten Mechanismus zu einer vermehrten Hormonausschüttung aus der NNR kommt. Weiterhin gibt es in der Literatur viele Berichte über Schwankungen der Ascorbinsäurekonzentration in den NN.

Schon K u c h e l und M i t c h e l l (48) haben vermutet, daß die

NNR-Aktivität mit der Höhe der Ascorbinsäurekonzentration in Beziehung steht. Nachdem S a y e r s und Mitarbeiter (75) fanden, daß der Cholesteringehalt der NNR ein Maß für die Rindenaktivität ist, bewiesen S a y e r s, S a y e r s, L i a n g und L o n g (77) an Meerschweinchen, daß der Cholesterin- und Ascorbinsäuregehalt in der NN bei Stress parallelen Schwankungen unterliegen, und sich diese Konzentrationsschwankungen nur auf das NNR-Gewebe beschränken. Mit einer vermehrten Ausschüttung von Rindenhormonen ist also ein Abfall der Ascorbinsäurekonzentration verbunden, und der Ascorbinsäuregehalt der NN somit ein brauchbarer Index für die Rindenaktivität.

S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) maßen an hypophysenektomierten Ratten den Ascorbinsäureabfall in der NN nach ACTH-Gaben und stellten eine direkte Abhängigkeit von der Dosierung der ACTH-Gaben fest.

Die zeitliche Verschiebung zwischen den morphologisch und chemisch wahrnehmbaren Veränderungen in der NNR nach Stress untersuchte K r a c h t (47). Er stellte fest, daß die Abnahme des Ascorbinsäuretiters in der NN bereits einen Höhepunkt erreicht hat zu einem Zeitpunkt, zu dem karyometrisch gerade erst Anzeichen einer Funktionssteigerung faßbar sind.

Die verschiedensten Stressoren wurden schon in ihrer Wirkung auf die NNR geprüft. So wurde nach der Verabreichung von Oestrogen (62), Äther (8, 49), Chloroform (49), Insulin (67), Diphterietoxin (30, 99), Tetanustoxin (29) und bei Infektionskrankheiten (60) ein Abfall der Ascorbinsäurekonzentration in der NN gemessen. Über ähnliche Ergebnisse berichten S a y e r s und S a y e r s (73) nach Gaben von Atropin, Nikotin, Histaminen, Dibenaminen, Sympathicolytika, nach intraperitonealer Verabreichung von Glukose, nach Blutverlust und nach Einwirkung von Kälte. Im Falle von Histamin und Kälte konnte sogar eine Relation zwischen der Intensität des Stresses und dem absoluten Ascorbinsäureabfall in der NN aufgezeigt werden.

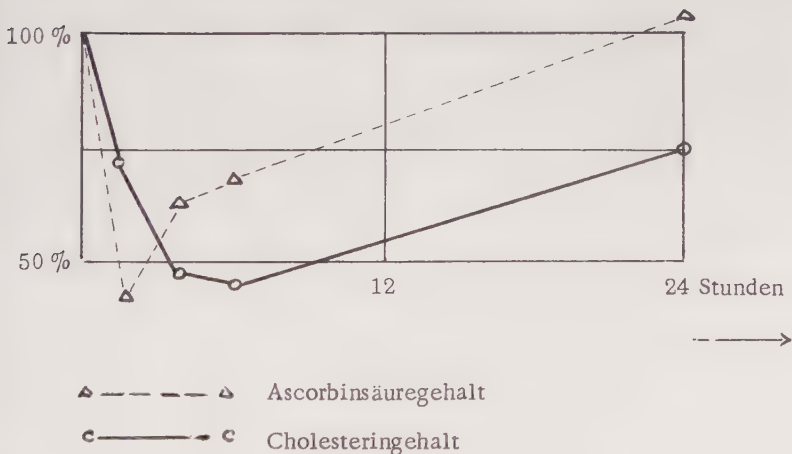
Diese im Endeffekt gleiche Wirkung der verschiedensten Stressoren im Organismus kann u.U. auch durch andere endokrine Leistungen eingeleitet werden. So bewirkt z.B. die Einwirkung von Kälte zuerst eine Ausschüttung von Thyroxin. Diese führt wieder sekundär zu einer vermehrten Bindung von ACTH und bei längerer Dauer des Versuches dadurch zur Hyper-

trophie der NNR. (G a b r i l o v e und S o f f e r (27)).

Um einen gewissen Überblick über die große Zahl der verschiedensten und manchmal widersprechenden Berichte über das Verhalten der Ascorbinsäure in der NN nach Einwirkung verschiedener Stressoren zu bekommen, unterscheiden S a y e r s und S a y e r s folgende Möglichkeiten:

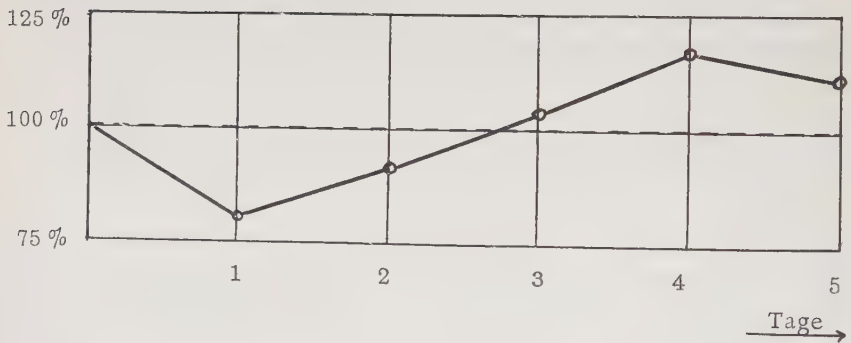
a) Ein kurzer, zeitlich begrenzter Stress:

(z.B. nicht tödlicher Blutverlust, kurze, schwere Muskelarbeit oder kurzwirkende Drogen. S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) verwenden in den entsprechenden Versuchen eine Injektion von 0,6 - 2,4 γ ACTH pro 100 g Körpergewicht.) Es entsteht im Organismus ein plötzlicher Bedarf an Rindenhormonen, was zu einem Anstieg der Rindenaktivität führt. Der Ascorbinsäuregehalt in der NN zeigt einen raschen Abfall, dem ein langsames Zurückkehren zur normalen Konzentration folgt. Die NN-Größe ändert sich kaum.



- b) Eine allmähliche Veränderung der inneren oder äusseren Gegebenheiten des Organismus:

(z.B. Hunger, Trächtigkeit, jahreszeitliche Schwankungen.) Der langsam ansteigende Bedarf an NNR-Hormonen bedingt eine ganz allmählich sich steigernde Rindenaktivität. Die Ascorbinsäurekonzentration bleibt ziemlich unverändert; die GröÙe der Drüse nimmt jedoch beständig zu.

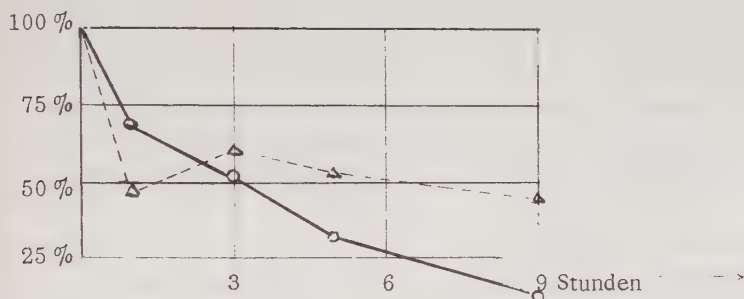


△ - - - - △ Ascorbinsäuregehalt

○ ——— ○ Cholesteringehalt

) Ein starker, bis zum Tode des Tieres anhaltender Stress:
(z.B. Verbluten, tödliche Brandwunden, schnell verlaufende tödliche Infektionskrankheit.)

Dem grossen, ständigen Bedarf an NNR-Hormonen entspricht der schnelle und konstante Abfall der Ascorbinsäurekonzentration. Die GröÙe der Drüse nimmt je nach der Dauer der Belastung entsprechend zu.



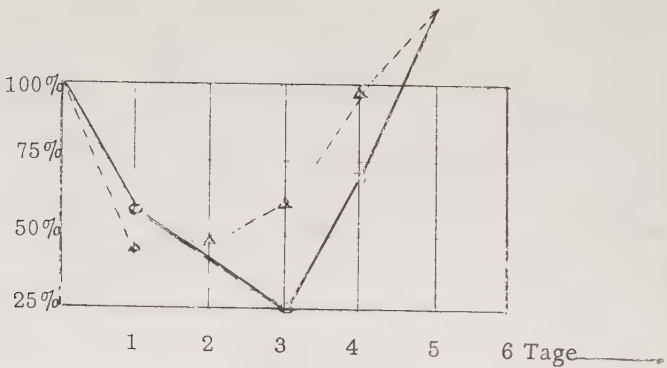
—○— Cholesteringehalt

- - - Δ - - - Ascorbinsäuregehalt

d) Adaptation an einem langen, starken Stress:

(z.B. Kälte, nicht tödliche Infektionskrankheit, Verabreichung von Stimulantien über längere Zeit.)

Während der Stressperiode wird die NN größer und der Ascorbinsäurespiegel sinkt ab. Nach Ende der Stresswirkung steigt der Ascorbinsäuregehalt über den normalen Stand.



△ - - - △ Ascorbinsäuregehalt

c ——— c Cholesteringehalt

3. Die biochemische Bedeutung der Ascorbinsäure in der Nebenniere.

Es liegt nahe, hinter diesen funktionellen Korrelationen der Cholesterin- und Ascorbinsäurekonzentrationen und der NNR-Aktivität eine biochemische Beziehung zu vermuten. Die Berichte über diese Frage sind sehr zahlreich, und die Versuche darüber sind noch nicht abgeschlossen.

B l o c h (6) mischte in das Futter von Ratten mit Deuterium markiertes Cholesterin und konnte im Harn die Ausscheidung von Pregnandiol feststellen, das dieses Isotop enthielt. Das ist insofern von Interesse, als Pregnandiol die Ausscheidungsform von Progesteron ist, eine Substanz, die den NN-Steroiden sehr ähnlich ist.

Nach S t a u d i n g e r (89) erfolgt die Biosynthese der NNR-Hormone über Essigsäure -- Cholesterin -- Pregnenolon -- Progesteron -- Corticosteron bzw. 17-Oxycorticosteron. Der Angriffspunkt des ACTH liegt nach ihm in der katalytischen Wirkung beim Abbau von Cholesterin zu Pregnenolon, was mit dem Abfall des Cholesteringehaltes in der NN nach ACTH-Gaben in Einklang steht. Auf die weiteren chemischen Aufbauprozesse soll ACTH keinen Einfluß mehr haben.

S a y e r s, W h i t e und L o n g (79) schließen auf Grund der geringen Mengen ACTH ($0,15 \mu$), die bereits eine Wirkung zeigen, ebenfalls auf eine katalytische Rolle des ACTH bei der Umwandlung von Cholesterin in Rindensteroiden. Auch nach H a y n e s, S a v a r d und D o r f m a n (37) beschleunigt ACTH weniger die Ausschüttung als vielmehr die Bildung von 17-Oxycorticosteron.

H o f m a n n und S t a u d i n g e r (40) fanden in bebrütetem NN-Brei bei Zusatz von 1 % Ascorbinsäure eine 2-3 fach höhere Ausbeute an Corticosteron und 17-Oxycorticosteron und vermuten daher einen Einfluß von Vitamin C auf die Biosynthese der Steroide. Allerdings erhalten sie auch ähnliche Effekte mit Fumarsäure und anderen Stoffen des Citronensäurezyklus.

Bei Versuchen in vitro konnten S c h m i d t und S t a u d i n g e r (81) feststellen, daß das Gleichgewicht Ascorbinsäure $\rightleftharpoons$ Dehydroascorbinsäure + H_2 bei pH 6,6 - 6,3 wirksam ist. Da dieser Säuregrad auch in der NNR gegeben ist, ist eine Beeinflussung ihrer Stoffwechselvorgänge, die ja im Wesentlichen nur der Produktion der Rindenhormone dienen, durch dieses Redoxsystem anzunehmen.

H e r r i c k, M e a d, E g e r t o n und H u g h e s (38) beobachteten, daß skorbutische Meerschweinchen nach Verabreichung von Cortison länger überleben, und die typischen Gelenkschmerzen nicht mehr auftreten. Auch die für Vitamin C-Mangel typischen Knochenveränderungen konnten nicht mehr festgestellt werden. S t e p t o und Mitarbeiter (91) berichten ebenfalls, daß Vitamin C-frei ernährte Meerschweinchen einen Mangel an Rindensteroiden aufweisen.

V o g t (103) untersucht die wichtige Frage, ob der Ascorbinsäureabfall in der NN nach Stress durch eine Ausschüttung des Vitamins C in das Blut erfolgt. Im Blut der NN-Vene vom Hund findet sie jedoch vor und nach Belastung des Organismus keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an Ascorbinsäure, die sie in freier Form und auch als Komplexverbindung zu erfassen suchte. V o g t widerspricht mit diesem Versuch der Hypothese von L ö w e n s t e i n und Z w e m e r (57), die vermuten, daß die Rindenhormone in komplexer Verbindung mit Vitamin C ausgeschüttet werden und auf diese Weise den Ascorbinsäureabfall in der Drüse erklären.

Der aus diesen Befunden resultierenden Auffassung über die Bedeutung des Vitamins C für die Biosynthese der Rindensteroiden stehen jedoch eine Reihe von Versuchen entgegen.

N i g e o n - D u r e u i l und R a t s i m a n a n g a (65) berichten, daß sich in der NN skorbutischer Meerschweinchen biologisch aktive Rindenhormone befinden und bestätigen damit die Versuche von E i s e n s t e i n und S h a n k (17). L i b r e t t i und T u s i n i (52) kommen ebenfalls zu dem Schluß, daß zur Produktion von Corticosteroiden Vitamin C in der NNR nicht vorhanden sein muß.

O e r t e l und H e i n (66) fanden papierchromatographisch bei skorbutischen Meerschweinchen eine Gesamtausscheidung der Ketosteroiden im 24-Stunden-Harn von $643 \frac{\mu}{\text{Tier/Tag}}$ gegenüber $230 \frac{\mu}{\text{Tier/Tag}}$ bei normaler Ernährung. Bei der Auftrennung des 17-Ketosteroidgemisches konnten die Autoren nachweisen, daß sich bei Vitamin C-freier Ernährung die Ausscheidungsmaxima der einzelnen Fraktionen verschieben, und zwar vermehrt sich die Ausscheidung der Stoffwechselprodukte des Dehydro- α -epi-androsterons. Da die Zunahme der 17-Ketosteroiden in dieser Fraktion auf eine gesteigerte NNR-Funktion zurückzuführen ist, halten die Verfasser den Einfluß des Vitamin C-Mangels auf die vermehrte NNR-Hormonausscheidung für hinreichend bewiesen.

L o n g (55) berichtet, daß skorbutische, Vitamin C-freie Meerschweinchen einen normalen Cholesteringehalt in der NN haben. Nach ACTH-Gaben fällt der Spiegel in üblicher Weise ab, und im Blutbild tritt Lymphopenie auf. Diese Reaktionen sind für die Ausschüttung von Rindenhormonen typisch.

Da sich der Vitamin C-Gehalt der NN nicht nur auf den Rindenanteil beschränkt, sondern auch im Mark nachgewiesen werden konnte, wurde früher eine Bedeutung für das im Mark vorhandene Adrenalin in Betracht gezogen, insbesondere, nachdem durch in vitro - Versuche (1, 107) gegenseitiger Oxydationsschutz festzustellen war. Auf Grund von Adrenalinuntersuchungen in NN skorbutischer Meerschweinchen kam K a r g (45) jedoch zur Auffassung, daß das Vitamin C für die in der NN vorhandene Menge an Adrenalin nicht von Bedeutung ist.

Da nun fast alle endokrinen Drüsen einen relativ hohen Gehalt an Ascorbinsäure aufweisen, glaubt V e r z á r (102) nicht an eine spezifische Funktion der Ascorbinsäure in der NN. Die Erhöhung ihrer Konzentration in einem Gewebe sei nur der physiologische Ausdruck eines gesteigerten Stoffwechsels.

4. Beziehungen zwischen Schilddrüse und Nebennierenrinde.

Erfahrungen über einen Zusammenhang in der Funktion der beiden Drüsen wurden schon von H o s k i n (41) mitgeteilt, nach dem die Fütterung von Ratten mit Schilddrüsen eine Hypertrophie der NNR bedingt. Später haben A m a n o (3) und G e r l e i (28) mit Thyroxingaben dasselbe erreicht. Eine durch HVL-Substanz - thyreotropes Hormon, TSH - bedingte experimentelle Hyperthyreose wirkt auf die NNR ebenfalls stimulierend. (L o e s e r (54), E m e r y und W i n t e r (18), M c Q u e e n - W i l l i a m s (69)). Ähnliche Beobachtungen machen C o h e n (14) und D e a n und G r e e p (16) nach Verabreichung thyreoider Substanzen.

W a l l a c h und R e i n e c k e (104) berichten, daß bei täglichen Thyroxingaben der Ascorbinsäuregehalt der NN von Ratten bis zum 4. Tag nach der ersten Verabreichung abfällt, dann wieder ansteigt, am 28. Tag ein Maximum erreicht und allmählich wieder zur Norm zurückkehrt. Ähnlich verhalte sich das NN-Gewicht. Die vermehrte Sekretion werde also allmäh-

lich durch vermehrte Synthese kompensiert. F e l d m a n (23) findet bei Thyroxingaben zwar ebenfalls eine geringe Zunahme von Größe und Gewicht der NN, bezeichnet die Veränderung jedoch als nicht signifikant. Dagegen teilen H o e n, L a n g e n f e l d und O e h m e (39) mit, daß die durch Thyroxin hervorgerufene Hypertrophie der NN bei Ratten durch gleichzeitige Verabreichung von Desoxycorticosteron verhindert werden kann.

Wie hyperthyreotische Zustände so rufen natürlich auch Hypothyreosen und Athyreosen Veränderungen in der NN hervor. Hypothyreosen können experimentell durch Verabreichung von Thiouracil leicht erzielt werden. Z a r - r o w und M o n e y (108) gaben daher Ratten 0,1 % Thiouracil in das Trinkwasser und konnten nach über 6-wöchiger Verabreichung eine funktionelle und morphologische Atrophie der NNR feststellen. Auch D e a n e und G r e e p (16) messen histochemisch einen bedeutenden Abfall des Steroidgehaltes in der Zona fasciculata der NNR nach Thiouracilgaben.

Als erste stellten 1927 S m i t h, G r e e n w o o d und F o s t e r (88) eine Verringerung der NN-Gewichte bei thyreoidektomierten Ratten fest. Diese Beobachtung wurde durch Versuche von L e b l o n d und H o f f (51) und B a u m a n n und M a r i n e (4) bestätigt.

V e r z á r (101) weist an Katzen nach, daß der Bedarf an NNR-Hormonen nach Thyreoidektomie von 0,4 mg/kg Körpergewicht auf 0,1 mg/kg sinkt. Allerdings sei bei Eintritt einer Krise die Verabreichung einer weit höheren Dosis erforderlich.

Nach einem Befund von M o r r i s (64) sollen dagegen bei thyreoidektomierten Küken die Körpergewichte abnehmen, während die NN-Gewichte fast konstant bleiben, also relativ hypertrophieren.

F r e e d m a n und G o r d o n (25) machen die Feststellung, daß bei Ratten nach der Exstirpation der Schilddrüse weniger eine deutliche Atrophie der NNR, als vielmehr eine starke Funktionshemmung, gemessen an der Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration, auftritt. Nach ihren Ergebnissen steigt der Ascorbinsäuregehalt, bezogen auf Normalwerte gleichschwerer Tiere, in der 1. Woche nach Exstirpation um ca. 20 % an und fällt dann beständig ab, um 4 Wochen p.op. etwa 20 % unter dem Normalwert zu liegen.

Den Mechanismus dieser Beziehung zwischen NNR und Schilddrüsenfunktion

untersucht F e l d m a n (23), der feststellte, daß bei hypophysen-ektomierten Ratten Thyroxingaben keinen Einfluß mehr auf die NN ausüben, was beweist, daß die Schilddrüse die NN nur über den intakten HVL beeinflussen kann.

S c h u l z e (83) stellt in Versuchen mit Meerschweinchen bei Vitamin C-Mangel eine deutliche Hyperthyreose fest, die er auf eine vermehrte Wirksamkeit des thyreotropen Hormons zurückführt. Als Folge der Hyperthyreose erscheint im weiteren Verlauf eine Hypertrophie der NNR. Andererseits vermindert sich nach seinen Versuchen das thyreotrope Hormon, so daß die Schilddrüse inaktiv wird. Durch Gaben von Rindenhormonen und gleichzeitiger Zufuhr von Vitamin C kann dieser Zustand wieder behoben werden. S c h u l z e sieht daher den HVL im Zentrum des endokrinen Systems "als Vermittler der zwischen den einzelnen Drüsen hin- und hergehenden Korrelationen".

Die Schilddrüse wird bekanntlich wie die NNR von einem adenotropen Hormon des HVL gesteuert. Von dieser Überlegung ausgehend folgern Z a r r o w und Z a r r o w (109) weiter, daß bei Thyreoidektomie der HVL durch die Überproduktion an thyreotropem Hormon nicht mehr in der Lage sei, genügend ACTH zu synthetisieren, was gezwungenermaßen zu einer NNR-Atrophie führen müsse. Gegen diese Auffassung sprechen die Befunde von H a l m i und B o g d a n o v e (35), die keine signifikanten Unterschiede zwischen dem ACTH-Gehalt der Hypophysen normaler und thyreoidektomierter Ratten finden. Sie stellen bei ihren Versuchen fest, daß nach Thyreoidektomie die Hypophysen der Ratten arm an acidophilen und beta-Zellen sind, und damit diese beiden Zellgruppen kein morphologisches Äquivalent des ACTH-Gehaltes sein können. Sie schließen jedoch nicht aus, daß das ACTH trotzdem in diesen Zellen gebildet wird. Die NNR-Atrophie erklärt sich nach den Autoren in einer Störung der Ausschüttung von ACTH.

F r e e d m a n und G o r d o n (26) kommen nach Versuchen an hypothyreoiden Ratten zu dem Ergebnis, daß bei diesen Tieren durch die Drosselung des Stoffwechsels ein geringerer Bedarf an Corticoidhormonen besteht, und der dadurch hohe Corticoidblutspiegel eine Ausschüttung von ACTH hemmt. Danach müßte in der Peripherie eine Verbindung bestehen zwischen dem Receptorensystem des Thyroxins und dem der NNR-Hormone.

5. Vitamin A-Mangel und seine Beziehung zur Nebennierenrinde.

Die Wirkungsweise fettlöslicher Vitamine, insbesondere des Vitamins A, auf das endokrine System ist immer noch unklar. So sind über den Einfluß des Vitamins A auf die NNR-Tätigkeit nur sehr widerspruchsvolle Berichte in der Literatur zu finden. Dagegen liegen viele Mitteilungen vor über einen Antagonismus zwischen Vitamin A und Thyroxin (S t e p p, K ü h n a u und S c h r o e d e r (90)). Da, wie in dem vorhergehenden Kapitel dargelegt ist, eine tatsächliche Beziehung zwischen der Schilddrüse und der NNR besteht, schließen die Mehrzahl der Autoren auf eine indirekte Beeinflussung der NN durch Vitamin A über die Schilddrüse.

S u r e, T h e i s s und H a r r e l s o n (92) messen schon 1939 den Vitamin C-Gehalt in der NN von Ratten bei Vitamin A-Mangel. Sie finden einen leichten Abfall der Ascorbinsäurekonzentration, der jedoch nicht signifikant ist und nicht sicher reproduziert werden kann.

M a y e r und K r e h l (59) beobachteten Skorbuterscheinungen bei Vitamin A-Mangelratten, die nach massiven Vitamin C-Gaben wieder verschwanden. Der Vitamin C-Blutspiegel sank bei den Mangeltieren um 50 - 66 %. Das Verhältnis NN-Gewicht zu Körpergewicht war um 2 - 4 mal größer als bei den Kontrolltieren, während die Werte der Ascorbinsäurekonzentration in der NN beständig unter denen der Kontrollen lagen.

Eine Erhöhung der absoluten NN-Gewichte sowohl bei Vitamin A-Mangel als auch bei experimentellem Vitamin A-Überschuß stellten M o n e y, F a g e r, L u c a s und R a w s o n (63) in Versuchen an infantilen männlichen Ratten fest.

Die histochemischen Veränderungen in der NNR bei Vitamin A-Mangel untersuchten L o w e, M o r t o n und H a r r i s o n (56). Sie fanden einen vermehrten Lipoidgehalt in der Zona glomerulosa und eine ungleiche Verteilung der Lipoidsubstanz in der Zona fasciculata. Phosphatide konnten nur noch in der Glomerulosa und in verminderter Menge festgestellt werden. Die Verfasser schließen daraus, daß die nach ihrer Ansicht vornehmlich in der Zona fasciculata vor sich gehende Bildung der Glucocorticoide bei Vitamin A-Mangel gestört sei, während die Mineralocorticoide in der Glomerulosa vermehrt synthetisiert würden.

M o n e y und Mitarbeiter (63) untersuchten bei Vitamin A-Mangelratten NN und Schilddrüse auf typische Veränderungen und stellten fest, daß sich

weder das Schilddrüsengewicht, noch die Anwesenheit von J¹³¹ in der Thyreoidea, noch die NN-Gewichte wesentlich verändern.

Dagegen sprechen jedoch die Angaben von M i t z k e w i t s c h (61), der bei A-avitaminotischen Ratten ein Abfallen des Schilddrüsengewichtes um 50 % und der NN-Gewichte um 50 % beobachtete. Die histologische Struktur der Schilddrüse unterscheidet sich dabei scharf von der normaler Tiere. Die Follikel epithelien sind stark mit Kolloid angefüllt und zeigen flache, ausgedehnte Kerne. Der Verfasser schließt aus diesem histologischen Befund, daß die Funktion der Schilddrüse stark vermindert ist. Die Hypertrophie trotz Hypofunktion sucht er mit der Kolloidanhäufung in den Follikeln zu erklären.

Die Hypophysen A-avitaminotischer Ratten sind vergrößert und haben einen höheren Gehalt an thyreotropem Hormon (S c h u l z e und H u n d - h a u s e n (84)). Verwertbare Veränderungen ihrer morphologischen Struktur sind jedoch nicht nachgewiesen. S c h u l z e (83) schließt daraus, daß es bei Vitamin A-Mangel zu einer gesteigerten Bildung von thyreotropem Hormon im HVL kommt, während vermehrte Zufuhr von Vitamin A die Bildung von thyreotropem Hormon hemmt. Dementsprechend findet sich bei Vitamin A-Mangel ein aktives, bei Vitamin A-Überschuß ein inaktives Schilddrüsenbild. Das Gewicht der NN, das bei den Versuchen mitgemessen wurde, veränderte sich weder bei Vitamin A-Mangel noch bei Vitamin A-Überschuß.

E u l e r (20) vermutet den Angriffspunkt des Vitamins A in der Peripherie. Er weist an Ratten nach, daß die nach Thyroxingaben auftretenden Gewichts- und Wachstumsabnahmen durch Zufuhr von Carotin per os kompensiert werden können. Dabei entsprechen 25 μ g Carotin ungefähr 50 μ g Thyroxin. E u l e r setzt allerdings keineswegs voraus, "daß Carotin (bzw. Vitamin A) und Thyroxin sich direkt neutralisieren oder auch Antagonisten in der gleichen Reaktion sind".

III. Versuche zur Methodik der Ascorbinsäurebestimmung in Nebennieren

1. Histologischer Nachweis.

Die Ascorbinsäure besitzt neben wenigen anderen Substanzen im Protoplasma die Fähigkeit, angesäuertes Silbernitrat zu reduzieren. Darauf beruht das insbesondere auf Arbeiten von Giroud und Leblond (32) zurückgehende Verfahren des Nachweises der Ascorbinsäure in Gewebsschnitten. Neuerdings hat Clara (13) in einem ausführlichen Sammelreferat zu diesem "histotopochemischen Ascorbinsäurenachweis in Gewebsschnitten" kritisch Stellung genommen. Danach wird die Aussagefreudigkeit dieser noch vielerorts geübten Methode im Hinblick auf ihre Spezifität und Empfindlichkeit der Einschränkung empfohlen. So reagieren z.B. außer Ascorbinsäure auch o-Dioxybenzolverbindungen, Lipofusazine, Codehydrasen und Lactoflavin. Weiterhin können Glutathion und Cystein bei dieser Reduktionsmethode störend in Erscheinung treten. Dehydroascorbinsäure, die ja mit der Ascorbinsäure in Redoxbeziehung steht, biologisch aktiv ist und im Gewebe immer einen Anteil der Gesamtascorbinsäure ausmacht, wird dabei überhaupt nicht erfaßt. Auch bestehen Zweifel, ob eiweißgebundene Ascorbinsäure bei der histochemischen Methode zur Reaktion gelangt. Auch an der absoluten Ortsidentität der Reduktionszentren, an denen sich die Silbergranula abscheiden, mit der Lokalisation der Ascorbinsäure in Geweben werden Zweifel geäußert. Clara kommt zu dem Schluß, daß ein histochemischer Ascorbinsäurenachweis jeweils durch eine andere Methode gesichert werden müßte. Insbesondere ist natürlich eine eindeutige quantitative Aussage mit der histochemischen Methode nicht möglich; der Schwellenwert, unter dem der Ascorbinsäurenachweis nicht mehr gelingt, ist etwa 10 mg%. Quantitative Aussagen über höhere Ascorbinsäurekonzentrationen stellen reine Schätzwerte ("stark mit Silbergranula beladen ..." u.ä.) dar.

Die Erwähnung dieser Methode erfolgt vor allem, weil in der einschlägigen Literatur noch verschiedentlich von ihrem Gebrauch berichtet wird. Für unsere eigenen Versuche stellten wir jedoch die angegebenen Bedenken in den Vordergrund, insbesondere da zur quantitativen Bestimmung der Gesamtascorbinsäure bewährte chemische Methoden zur Hand waren.

2. Chemische Bestimmung.

a) Die chemischen Grundlagen des kolorimetrischen Verfahrens mit Dinitrophenylhydrazin.

Zur Bestimmung des Vitamins C speziell von NN von Ratten wurde von S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) das chemische Verfahren eingeführt, das R o e und K u e t h e r (70) entwickelt hatten. Die Ascorbinsäure wird nach Fällung und Extraktion aus dem Gewebe mit Trichloressigsäure in Anwesenheit von Aktivkohle gereinigt und zu Dehydroascorbinsäure oxydiert. Das Filtrat wird in durch Zugabe von Thioharnstoff mild reduzierendem Medium mit dem Reagenz 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt. Nach mehrstündigem Erwärmen bei 37° C wird durch Zugabe von Schwefelsäure der endgültige Farbkomplex erreicht, der mehrere Stunden stabil ist und bei 540 m μ eine Absorptionsbande zeigt. Die Anwendbarkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermöglicht eine quantitative Auswertung.

Das 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagiert vor allem mit den Abbauprodukten des Vitamins C, am schnellsten mit der Diketogulonsäure, etwas langsamer mit der Dehydroascorbinsäure und nur sehr zögernd mit der Ascorbinsäure selber (71). Um die Ascorbinsäure quantitativ zu erfassen, wird sie daher bei der chemischen Aufarbeitung in Dehydroascorbinsäure überführt. Die gleichzeitige Mitbestimmung der Diketogulonsäure, dem ersten Abbauprodukt der Dehydroascorbinsäure, ist keineswegs störend, sondern eher erwünscht, da nach Versuchen von B o r s o o k, D a v e n p o r t, J e f f r e y und W a r n e r (7) Dehydroascorbinsäure in vitro sehr schnell durch das pH und die Temperatur der Gewebe oxydiert wird. Eine gemeinsame Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure muß angestrebt werden, um die Gesamtheit des von diesen beiden Stoffen gebildeten Redoxsystems zu erfassen.

Diese Ascorbinsäurebestimmungsmethode haben M a y e r, H a s e l b a c h und B o i s s o n n a s (58) umgewandelt und vereinfacht, um dadurch eine schnelle Serienarbeit zu ermöglichen. Auf die Verwendung von Aktivkohle wurde verzichtet und ihre reinigende Funktion durch Celite 535 ersetzt, während für die Oxydation Brom eingeführt wurde, dessen Überschuß durch Anilin entfernt wird. Durch Erhöhung der Temperatur auf 100° C wurde die Dauer der Erwärmung von 3 Stunden auf 5 Minuten reduziert. Ausserdem erfolgte eine Herabsetzung der Schwefelsäure-

konzentration. Auch bei diesem Verfahren erfolgt die Messung bei 540 m μ mit dem Unicam-Spektrophotometer "oder jedem anderen Kolorimeter".

Es ist wichtig, die auf 5 Minuten verkürzte Erwärmungsdauer genauestens (Stoppuhr) einzuhalten, da nach der Arbeit von Roe, Mills, Oesterling und Dameron (71) eine vollständige quantitative Verbindung von Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure mit Dinitrophenylhydrazin erst nach 18 Stunden erreicht wird. Durch den regelmässigen, vorzeitigen Abbruch dieser Farbreaktion wird die erhaltene Farbqualität nur von der Geschwindigkeit des chemischen Prozesses bestimmt. Diese Geschwindigkeit hängt ab von der Konzentration des zu bestimmenden Stoffes (Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure), von der Konzentration des reduzierenden Agens und von der Temperatur. Daraus ergibt sich, daß bei allen Versuchen neben der Erhitzungsdauer auch die Erhitzungshöhe und die Konzentration des reduzierenden Mediums (Thioharnstoff) unbedingt konstant gehalten werden müssen.

b) Untersuchungen über die Spezifität des "Celite"-Verfahrens.

Beschreibung des Verfahrens nach Mayer, Haselbach und Boissonas.

Reagenzien:

1. Trichloressigsäure 4 %ig
2. Dinitrophenylhydrazin in 2%iger Lösung von 9-n H₂SO₄
3. H₂SO₄ 70%ig
4. Bromwasser, gesättigte Lösung (3,5 g ad 100 ml aqua dest.)
5. Anilin 3 Vol.-% in 9-n H₂SO₄
6. Celite 535 (Fa. Schneider & Cie., Winterthur).

Ausführung:

In einem trockenen Zentrifugenglas, in dem 5 ml Trichloressigsäure vorgelegt sind, wird eine Ratten-NN mit ca. 50 mg Celite (geeichter Löffel) mittels eines Glasstabes zerrieben. Filtrieren durch einen Glasfilter G 3. 2 ml Filtrat werden in ein Reagenzglas pipettiert (Parallelprobe). Zugabe von 0,1 ml Bromwasser. Schütteln. Weniger als 1 Minute danach

0,1 ml Anilin zugeben. Schütteln. Zugabe von 0,5 ml Dinitrophenylhydrazin. Schütteln. Reagenzglasständer genau 5 Minuten in siedendes Wasser tauchen und dann in kaltes Wasserbad stellen. In den folgenden 5 Minuten in jedes Glas 5 ml H_2SO_4 geben. Schütteln. Nach 5 Minuten aus dem Bad nehmen und im Spektrometer bei 540 m μ gegen den Blindwert ablesen. Die Blindversuche werden mit allen Reagenzien, aber ohne Drüse durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollte zur chemischen Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes der Ratten-NN dieses "Celite"-Verfahren Anwendung finden. Folgende zwei Beobachtungen drängten jedoch zur Überprüfung dieses Schnellbestimmungsverfahrens auf seine Spezifität:

1. konnten wir feststellen, daß sich bei der Untersuchung von NN bereits vor dem Erhitzen ein typischer Farbton bildet, während bei der Bestimmung von Ascorbinsäure-Standardlösungen der Farbton erst beim Erhitzen auftritt.
2. erwiesen sich die Ascorbinsäurewerte in den NN, die nach dem "Celite"-Verfahren ermittelt wurden, um 20 % höher (568 mg%), als die Mittelwerte, die nach dem ursprünglichen, von uns modifizierten "Kohle"-Verfahren (s.u.) gewonnen wurden (463 mg%) (Tabelle 1).

Versuche an Rinder- und Schweine-NN

Um einen Anhaltspunkt über die Natur der Stoffe zu bekommen, die in "Celite"-Verfahren zu den höheren Extinktionen führen, wurde versucht, nach beiden genannten Verfahren die Ascorbinsäuregehalte getrennt im NNM und in der NNR zu bestimmen. Hierzu empfahl sich jedoch die Verwendung grösserer NN als solche von Ratten, um eine exakte Präparation zu gewährleisten und um gleichzeitig eine grössere Substanzmenge für Parallelbestimmungen zu gewinnen. Diese Versuche wurden daher mit Rinder- und Schweine-NN durchgeführt. Die NN wurden unverzüglich nach der Schlachtung den Tieren entnommen, Rinden- und Marksubstanz sorgfältig freipräpariert und von beiden Teilen Stückchen in der Größenordnung von 20 - 40 mg aufgearbeitet. Die Mittelwerte dieser Parallelbestimmungen sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 1

Gegenüberstellung der mit dem "Celite"- und "Kohle"-Verfahren bestimmten Ascorbinsäuregehalte in den NN gleichschwerer Ratten.

Ascorbinsäurekonzentration in mg%	
"Celite"-Verfahren	"Kohle"-Verfahren
503	483
557	446
559	481
518	426
675	455
577	409
590	510
565	494
Durchschnitt: 568	463

D = 21%

t-Test: t = 6,2
 p 0,10 %

Tabelle 2

"Vitamin C"-Gehalt in Rinder- und Schweine-Nebennieren

Vitamin C in mg%		Vitamin C-Relation
NNR	NNM	NNR:NNM
1. Rinder	a) "Celite"-Verfahren	
326	1085	1:3,33
301	1451	1:4,68
	b) "Kohle"-Verfahren	
295	189	1:0,64
274	201	1:0,73
2. Schweine	a) "Celite"-Verfahren	
292	1152	1:3,95
236	1170	1:4,96
331	879	1:2,66
	b) "Kohle"-Verfahren	
273	379	1:1,39
251	518	1:2,03

Es ist ersichtlich, daß die Ascorbinsäurewerte der NNR-Proben nach beiden Verfahren vergleichbare Werte zeigen, während im NNM vor allem die mit dem "Celite"-Verfahren erhaltenen Werte, bezogen auf Ascorbinsäure, unverhältnismäßig hohe Abweichungen ergeben. Besonders deutlich wird dies bei den Vergleichsproben von Rinder-NN. Nach den Befunden von G i r o u d (31) war die Relation NNR:NNM-Ascorbinsäure bei Rindern 1:0,63. Dies stimmt weitgehend mit den Werten überein, die wir bei den entsprechenden Proben mit dem von uns modifizierten "Kohle"-Verfahren feststellen konnten. Die Werte der Schweine-NN weisen größere Schwankungen auf. Das mag einerseits auf die schwierigere und ungenauere Trennung von Mark- und Rindensubstanz der kleineren Drüsen zurückzuführen sein, andererseits auch auf die individuellen Unterschiede des Funktionszustandes der Drüsen durch die unterschiedliche Vorbehandlung der Schweine beim elektrischen Töten. Wesentlich ist jedoch, bei den Werten der Schweine-NN ebenso wie bei denen der Rinder, das deutliche Ansprechen des "Celite"-Verfahrens auf die Markproben.

Adrenalin-Versuche

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe zu untersuchen, ob Adrenalin bei diesen Bestimmungsverfahren in Erscheinung tritt und etwa Vitamin C vor-täuschend wirkt. Es wurden daher Lösungen verschiedener Konzentration von reinem l-Adrenalin krist. (Fa. Th. Schuchhardt, München) in 4%iger Trichloressigsäure hergestellt und für die folgenden Versuche verwendet.

Unter Beachtung der obigen Vorschrift für die Ascorbinsäurebestimmung nach M a y e r und Mitarbeiter ergab sich bei qualitativer Prüfung des l-Adrenalins ein rötlicher Farbton, der mit seiner Extinktion bei 530 m μ gemessen werden konnte und bereits vor dem Erhitzen in voller Intensität in Erscheinung trat - im Gegensatz zu Ascorbinsäureversuchen. In weiteren Versuchen konnte festgestellt werden, daß diese Farbreaktion des Adrenalins bei dem "Kohle"-Verfahren nicht zustande kommt. Die Annahme, daß es sich hier um einen unterschiedlichen Adsorptionseffekt von Kohle bzw. Celite gegenüber Adrenalin handelt, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da in qualitativen Versuchen festgestellt wurde, daß eine mit Kohle vorbehandelte Adrenalinlösung nach Zugabe von Bromwasser trotzdem eine Farb-reaktion zeigt. Als ausschlaggebend für die Reaktion erwies sich also die Behandlung mit Brom, das von den Autoren als Oxydationsmittel zur Umwandlung von Ascorbinsäure in Dehydroascorbinsäure in das Verfahren eingeführt wurde.

Bei Überprüfung der quantitativen Beziehung ergab sich weiterhin die Tatsache, daß auch die Einwirkungszeit des Broms auf Adrenalin von Bedeutung ist. Hält man sich nämlich nur an die Vorschrift der Ascorbinsäurebestimmung nach Mayer, Haselbach und Boissonnas (58), daß der Anilinzusatz - die oxydative Wirkung des Broms wird durch Bildung von Bromanilin dadurch sofort gehemmt - innerhalb einer Minute nach Bromzugabe zu erfolgen hat, so kommt man hinsichtlich des Adrenalins zu nicht reproduzierbaren Werten. In den folgenden Versuchen wurde daher die Bromeinwirkungszeit variiert, indem Anilin exakt 10 bzw. 50 Sekunden nach der Bromzugabe zugesetzt wurde. Gleichzeitig wurde auch der Erwärmungseffekt auf die Adrenalinfarbreaktion beobachtet (Tabelle 3).

Tabelle 3

Einfluß der Bromeinwirkungszeit auf die Extinktion bei Bestimmung von Adrenalinstandard mit dem "Celite"-Verfahren mit und ohne Erhitzen.

	Konzentration $\bar{x}$	Bromeinwirkungszeit			
		ohne Erhitzen		mit Erhitzen	
		10 Sek.	50 Sek.	10 Sek.	50 Sek.
Adrenalin	25	0.100	0.450	0.105	0.104
	50	0.209	0.432	0.201	0.200
	75	0.309	0.511	0.300	0.302
	100	0.406	0.489	0.410	0.410
	150	0.591	0.392	0.585	0.580
Ascorbinsäure	50	keine messbaren Werte		0.200	0.205

Die Extinktionen bei den 50 Sekundenwerten liessen keine Aussagen über unterschiedliche Adrenalinmengen zu. Weiterhin zeigte sich dabei eine nicht verwertbare Abhängigkeit von der Erwärmung.

Überraschend lineare Beziehungen zwischen Adrenalinlösung und Extinktion ergaben sich jedoch bei der Bromeinwirkungszeit von weniger als 10 Sekunden. Hierbei erwies es sich für bedeutungslos, ob die Proben der für Ascorbinsäure vorgeschriebenen Erwärmung unterworfen wurden oder nicht. Unter dieser Voraussetzung ist eine quantitative, kolorimetrische Auswertung

tung auf Grund des Lambert-Beer'schen Gesetzes möglich, und das Verfahren also geeignet, Adrenalin quantitativ zu bestimmen. Eichkurve siehe Abb. 1.

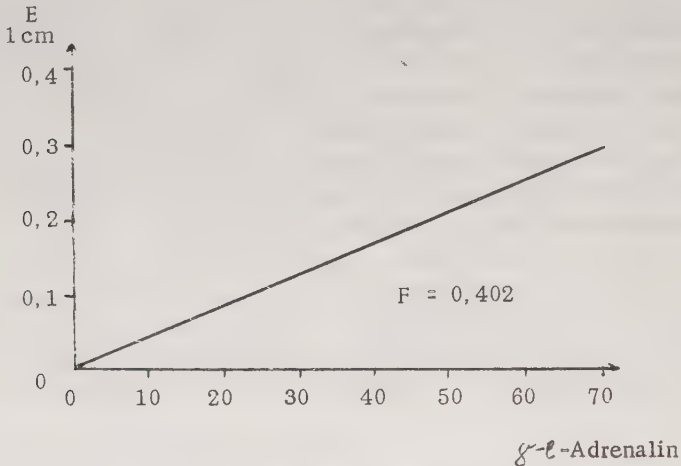


Abb. 1

Eichkurve, Elko II, 530 m μ 1-Adrenalin bezogen auf 5 ml Ausgangslösung nach dem "Celite"- Verfahren

Für die Ascorbinsäure ist es gleichgültig, ob die Bromeinwirkungszeit 10 oder 50 Sekunden dauert. Ohne Erhitzen erscheint eine geringe, nicht meßbare Farbbildung, die auf die Eigenfarbe des zugesetzten Reagens zurückzuführen ist. Die Eichkurve ist in Abb. 2 dargestellt.

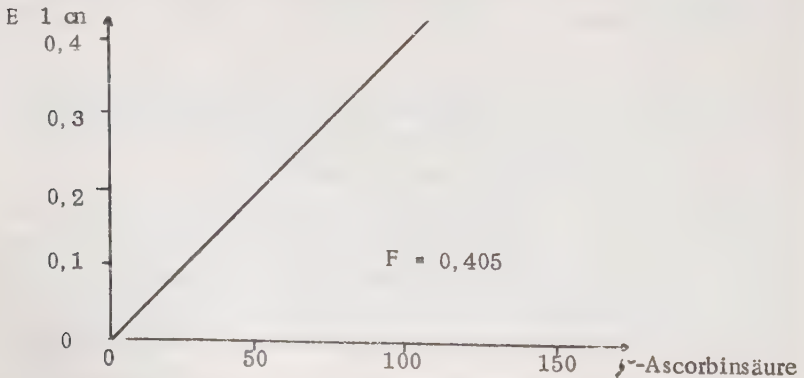


Abb. 2 Eichkurve, Elko II, 530 m μ Ascorbinsäure bezogen auf 5 ml Ausgangslösung nach dem "Celite"- Verfahren

c) Das modifizierte "Celite"-Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von Ascorbinsäure und Adrenalin in Nebennieren.

Die folgenden Versuche zielten nun darauf hin, bei gleichzeitiger Gegenwart von Adrenalin und Ascorbinsäure diese beiden Stoffe gleichzeitig quantitativ zu bestimmen. Es wurde zu diesem Zweck ein Gemisch reiner Adrenalin- und Ascorbinsäurelösungen bekannter Konzentrationen hergestellt. Die Ausgangsmenge der angegebenen ursprünglichen Vorschrift (5 ml) erlaubt eine Parallelprobe. Davon wurde mit Probe I wie bisher verfahren (Bromeinwirkungszeit jedoch maximal 10 Sekunden), so daß sich die vor dem Erhitzen entstehende Extinktion des Adrenalinwertes zu der beim Erhitzen entstehenden Extinktion des Ascorbinsäurewertes addierte. Der Adrenalinwert allein wurde in Probe II ermittelt, die der gleichen Behandlung wie Probe I unterzogen wurde, jedoch unter Weglassen des Erwärmens. Die Differenz der Extinktionen beider Proben ergibt, auf der Ascorbinsäureeichkurve abgelesen, die "wahre" Ascorbinsäuremenge (Tabelle 4, Abb. 3).

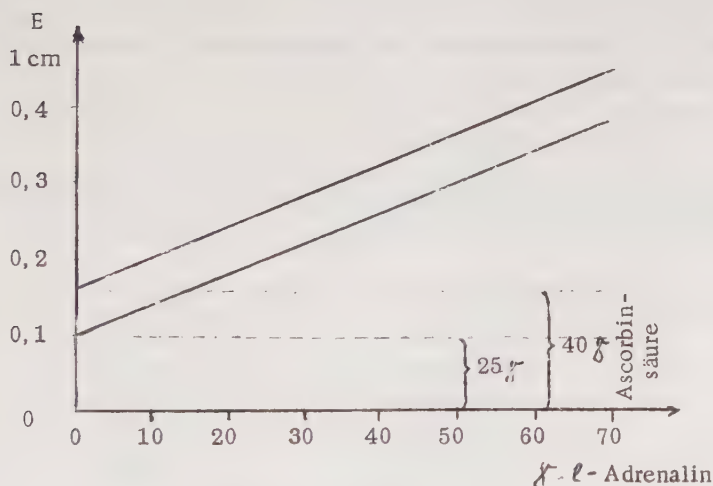


Abb. 3

Verschiebung der l-Adrenalin-Eichkurve um den Ordinaten-betrag der Ascorbinsäureextinktion

Tabelle 4

Beispiel einer kombinierten Ascorbinsäure-Adrenalinbestimmung nach dem "Celite"-Verfahren mit Standardlösungen.

	Vorlage	Extinktion
Probe I	50 μ Ascorbins. + 20 μ Adrenalin (mit Erhitzen)	0,280
Probe II	50 μ Ascorbins. + 20 μ Adrenalin (ohne Erhitzen)	0.083
D	I gegen II gemessen	0.189
Zusatzversuche:		
	20 μ reines Adrenalin	0.086
	50 μ reine Ascorbinsäure	0.194

Dieses Verfahren, das im Folgenden nochmals ausführlich beschrieben wird, wurde am hiesigen Institut in weiteren Arbeiten von K a r g (45, 46) auf seine Verwendbarkeit im biologischen Material untersucht. Es ist geeignet, gleichzeitig den Ascorbinsäure- und Adrenalingehalt in NN von Ratten zu bestimmen. Dazu Tabelle 5.

Tabelle 5

Beispiel einer kombinierten Ascorbinsäure-Adrenalin-Bestimmung in einer Ratten-NN nach dem "Celite"-Verfahren.

Ratte

80 g, NN links 6,8 mg

Probe I	(mit Erhitzen)	E = 0.169
	(= 42 μ Ascorbinsäure im Sinne von (58)).	
Probe II	(ohne Erhitzen)	E = 0.048
	(= 11 μ Adrenalin)	
D	(I gegen II gem.)	E = 0.120
	(= 30 μ "wahre" Ascorbinsäure)	

Beschreibung des "Celite"-Verfahrens zur Ascorbinsäure- und Adrenalinbestimmung in NN von Ratten.

Reagenzien:

Trichloressigsäure 4%ig

Dinitrophenylhydrazin in 2%iger Lösung von 9-n H_2SO_4

H_2SO_4 70%ig

Bromwasser, gesättigte Lösung (3,5 g ad 100 ml aqua dest.)

Anilin 3 Vol.-% in 9-n H_2SO_4

Celite 535 (Fa. Schneider und Cie., Winterthur)

Ausführung:

Eine NN wird in einem trockenen Zentrifugenglas (10 ml), in dem 5 ml Trichloressigsäure vorgelegt sind, mit ca. 50 mg Celite 535 (geeichter Löffel) zerrieben. Filtrieren durch einen Glasfilter G3 (wir verwenden dazu sogenannte Allihn'sche Rohre) in ein Reagenzglas. Daraus werden je 2 ml in die Reagenzgläser I und II pipettiert. Zugabe von 0,1 ml Bromwasser. Schütteln. Unmittelbar danach (5-10 Sekunden) Zugabe von 0,1 ml Anilin. Schütteln. Zugabe von 0,5 ml Dinitrophenylhydrazinlösung. Schütteln. Probe I genau (Stoppuhr) 5 Minuten in siedendes Wasser tauchen, dann zusammen mit Probe II in kaltes Wasserbad stellen. Vorsichtige Zugabe von 5 ml Schwefelsäure zu beiden Proben. Schütteln. Nach 5 Minuten beide Proben aus dem Wasserbad nehmen. Messung in 1-cm-Küvetten im Spektrophotometer oder Elektrokolorimeter bei $530 \text{ m}\mu$ gegen Blindwert. Letzterer wird ermittelt durch das gleiche Verfahren, aber ohne Drüse.

Dann ist Probe I gegen den Blindwert = Ascorbinsäure+Adrenalin.

Dann ist Probe II gegen den Blindwert = Adrenalin.

Die Differenz (Ascorbinsäure) kann errechnet, aber auch durch Messung Probe I gegen Probe II gleich ermittelt werden. Die Genauigkeit des Verfahrens + 1 % für Ascorbinsäure- bzw. Adrenalinwerte bis zu 100 μ bezogen auf $\bar{5}$ ml Ansatz.

d) Das vereinfachte "Kohle"-Verfahren; Untersuchungen über die Fehlermöglichkeiten beim Einsatz der Kohle.

Wie oben schon angedeutet, haben wir uns auch bemüht, die "klassische" Methode des Kohleverfahrens von R o e und K u e t h e r (70) im Sinne von M a y e r und Mitarbeiter zu vereinfachen. Aus den bereits dargelegten Gründen der Erhaltung der Spezifität haben wir uns jedoch auf die Variation der Erwärmungszeit und -höhe beschränkt. Mit diesem modifizierten "Kohle"-Verfahren kann der Ascorbinsäuregehalt in Ratten-NN mit genügender Genauigkeit schnell und einfach bestimmt werden.

Beschreibung des "Kohle"-Verfahrens zur Ascorbinsäurebestimmung in NN von Ratten.

Reagenzien:

Dinitrophenylhydrazin in 2%iger Lösung von $9-n \text{ H}_2\text{SO}_4$

Aktivkohle p.a.

Trichloressigsäure 4%ig

H_2SO_4 70%ig

Thioharnstofflösung (10 g Thioharnstoff werden in 100 ml 50%igem Aethylalkohol gelöst. Die Lösung ist 2 Monate lang haltbar und muß KMnO_4 reduzieren.)

Ausführung:

Die präparierte NN wird in einem Zentrifugenglas mit 5 ml Trichloressigsäure versetzt und mit einem Glasstab zerrieben, was durch Zusatz von etwas Quarzsand erleichtert wird. Dann werden 0,5 g Kohle zugesetzt und mit dem Glasstab beständig gut aufgerührt. Nach 3-4 Minuten filtriert man durch einen Glasfilter G3 (oder auch Allihn'sche Rohre). Aus dem Filtrat gibt man 3 ml in ein weiteres Reagenzglas und fügt einen Tropfen Thioharnstofflösung zu. Schütteln. Zugabe von 1 ml Dinitrophenylhydrazinlösung. Schütteln. In einem Reagenzglasständer wird das Glas genau 5 Minuten (+ 5 Sekunden) in ein siedendes Wasserbad getaucht und anschließend im kalten Wasserbad gekühlt. Im Wasserbad gibt man sofort 5 ml 70%ige H_2SO_4 zu und schüttelt kräftig. Nach vollständiger Abkühlung, etwa nach 10 Minuten, wird im Spektrophotometer (a. Elko II) bei 530 m μ in einer 2-cm-Küvette gegen den Blindwert abgelesen. Letzterer wird in analoger Weise, doch ohne Drüse ermittelt. Eichkurve siehe Abb. 4.

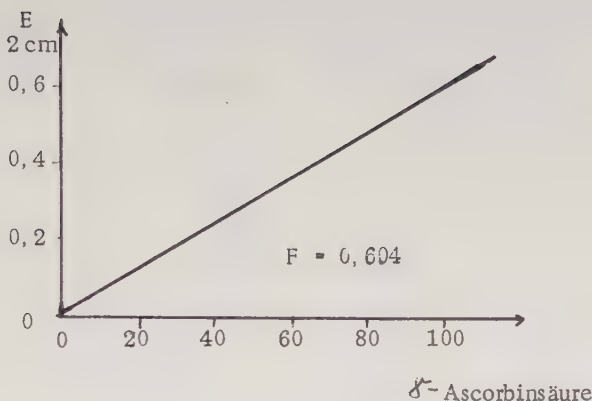


Abb. 4

Eichkurve Elko II, 530 m μ , Ascorbinsäure bezogen auf 5 ml Ausgangslösung. "Kohle"-Verfahren.

Nach Angaben von S a b a l i t s c h k a (72) bleibt in 2%iger Metaphosphorsäure gelöste Ascorbinsäure 2 Tage stabil. Durch Trichloressigsäure soll der Oxydationsschutz der Ascorbinsäure nicht in dem Maße gewährleistet sein. Da zur Aufstellung der Eichkurve eine längere Haltbarkeit der Standardlösungen vorteilhaft ist, wurden die Eichlösungen mit Metaphosphorsäure hergestellt. Bei längerem Stehenlassen der Lösungen steigen jedoch die Extinktionswerte an. Die Angaben von S a b a l i t s c h k a konnten in eigenen Versuchen bestätigt werden (Tabelle 6).

Die Spezifität des modifizierten "Kohle"-Verfahrens gegenüber Adrenalin wurde in den folgenden Versuchen überprüft. In 3 Parallelversuchen wurden Ascorbinsäurestandardlösungen mit und ohne Zusatz von Adrenalin bestimmt. Die Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabelle 7 zeigt, daß die Bestimmung der Ascorbinsäure durch die Gegenwart von Adrenalin nicht gestört wird. Adrenalinzusatz zum Blindwert ergab ebenfalls keine erhöhte Farbintensität gegenüber den normalen Werten.

Tabelle 6

Beständigkeit der Ascorbinsäurestandardlösungen.

50 μ Ascorbinsäure gelöst in 2%iger Metaphosphorsäure.

Tage nach Herstellung der Lösung	Extinktion
0	0.304
1	0.302
2	0.305
3	0.315
5	0.335

Tabelle 7

Einfluß von Adrenalin auf das "Kohle"-Verfahren.

	Vorlage	Extinktion
1.	30 μ Ascorbinsäure ohne Adrenalinzusatz	0,205
	30 μ " mit 20 μ "	0.201
2.	30 μ " ohne "	0.187
	30 μ " mit 50 μ "	0.189
3.	30 μ " ohne "	0.200
	30 μ " mit 100 μ "	0.202
	Blindwert (gegen H_2O)	0.045
	Blindwert + 20 μ Adrenalin (gegen H_2O gem.)	0.041
	Blindwert + 100 μ Adrenalin (gegen H_2O gem.)	0.046

In weiteren Versuchen sollten die Fehlermöglichkeiten dieses Verfahrens, insbesondere beim Einsatz der Kohle überprüft werden. Die Untersuchungen erstreckten sich auf Kohleart, Kohlemenge, sowie Einwirkungszeit der Kohle.

Verschiedene Kohlearten

Die von R o e und K u e t h e r (70) empfohlene Vorbehandlung der

Kohle (Waschung mit 10%iger HCl) ist umständlich und hat in den Ergebnissen nicht immer befriedigt. Wir haben deshalb verschiedene handelsübliche Kohlearten auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden beim obigen Verfahren die Blindwerte, die mit den Kohlearten erstellt wurden, gegen einen Blindwert ohne Kohlezusatz abgelesen (Tabelle 8).

Tabelle 8

Kohleart	Extinktion
Aktivkohle p.a.	0.008
Carbo animalis	0.025
Carbo activatus	0.060

Die Versuche mit Carbo activatus und mit Carbo animalis zeigten große Schwankungen und zeigten im Mittel eine wesentliche Abweichung vom kohlefreien Blindwert. Im Gegensatz dazu erwies sich in den Versuchen mit Aktivkohle p.a. (Fa. Merck, Darmstadt) die äußerst geringfügige Abweichung vom Blindwert als ziemlich konstant. Diese Aktivkohle p.a. fand bei unseren Versuchen ohne weitere Vorbehandlung Verwendung, wobei von Zeit zu Zeit eine Überprüfung in angegebener Weise erfolgte.

Kohlenmenge

Steigert man die Menge der zugesetzten Aktivkohle bei gleichbleibender Ascorbinsäurekonzentration, so erhält man stark sinkende Extinktionswerte, und zwar sinkt z.B. die für 50 μ Ascorbinsäure charakteristische Extinktion bei einer Mehrzugabe von 100 mg Kohle fast regelmäßig um den Wert von 0.030 (Tabelle 9).

Daraus ist zu folgern, daß eine genaue Einwaage der Kohle erforderlich ist. Die Benützung eines geeichten Löffels genügt nicht, da bei der leichten Komprimierbarkeit der Aktivkohle dabei die erforderliche Genauigkeit nicht erreicht werden kann.

Tabelle 9

Zugesetzte Menge Aktivkohle in g	Extinktion
0,1	0.420
0,2	0.389
0,3	0.361
0,4	0.332
0,5	0.302
0,6	0.275

Einwirkungszeit der Kohle

Bei gleichbleibender Ascorbinsäurekonzentration und konstanter Kohlenmenge zeigte sich kein Einfluß verschiedener Einwirkungszeiten zwischen 1 und 16 Minuten.

Aus Tabelle 10 ist ersichtlich, daß die Einwirkung von Aktivkohle p.a. schon in einer Menge von 0,1 g während einer Minute bei Standardlösungen hinreichend ist. Für die Praxis der NN-Untersuchungen halten wir die Verwendung von genau 0,3 bzw. 0,5 g Aktivkohle p.a. während 3-4 Minuten für geeignet. Die quantitative Oxydation der Ascorbinsäure ist gesichert durch das herrschende saure Milieu, das durch die Trichloressigsäure gegeben ist.

Tabelle 10

Einwirkungszeit von Kohle in Minuten	Extinktion
1	0.311
2	0.309
5	0.308
9	0.310
16	0.316

Die Messungen wurden mit 50 μ Ascorbinsäure durchgeführt.

Zusatz von Ascorbinsäure zu Ratten-NN

Nach Mitteilungen von S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) und eigenen Erfahrungen findet man in beiden NN eines Tieres mit geringen Schwankungen die gleiche Ascorbinsäurekonzentration bezogen auf das NN-Gewicht. Mit wenig Ausnahmen differiert die Konzentration der linken und rechten NN nicht mehr als um 25 mg Ascorbinsäure auf 100 g NN-Gewebe. Durch Zusatz von reiner Ascorbinsäure zu einer der beiden NN gesunder Ratten konnte die Genauigkeit des Verfahrens bei Bestimmungen im biologischen Material einigermaßen überprüft werden (Tabelle 11). Durch die biologischen Schwankungen ist allerdings eine genaue quantitative Kontrolle und Erfassung der zugesetzten Ascorbinsäure nicht möglich. Die Versuche beweisen jedoch, daß schon ein geringer Zusatz von Ascorbinsäure (20 μ) größenordnungsmäßig sicher nachgewiesen werden kann.

Tabelle 11

Zusatz von Ascorbinsäure zu Nebennieren

	Gewicht der NN in mg	Absolut.As- corbinsäure- gehalt in μ	Ascorbinsäure- Konzentr. in mg% (Zusatz abgezogen)
Ratte I			
linke NN	10,4	46	440
rechte NN+20 μ Ascorbinsäure	9,8	63	436
Ratte II			
linke NN	11,7	49	419
rechte NN+20 μ Ascorbinsäure	11,4	67	408
Ratte III			
linke NN	10,9	47	428
rechte NN+20 μ Ascorbinsäure	10,3	65	432

IV. Tierversuche

1. Versuchsmaterial und Versuchsanordnung.

Für die Versuche fanden im Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere gezüchtete, männliche Albinoratten des Sprague-Dawley-Stammes Verwendung. Sämtliche Versuchstiere wurden bei einer Zimmertemperatur von ca. 22° C in Glaskäfigen gehalten und jeweils ungefähr zur gleichen Tageszeit durch Dekapitation rasch getötet. Die Beeinflussung der Ergebnisse durch einen umweltbedingten Stress wurde weitgehend ausgeschaltet.

Die Versuchstiere wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt;

Gruppe I und II bestand aus 23 gesunden, mit normaler Zuchtkost (2/3 Weizen und 1/3 Mais) gefütterten Ratten. Davon wurden 12 Tiere (Gruppe I) bei einem Körpergewicht zwischen 70 und 120 g, im Durchschnitt 92 g, getötet. Diese Ratten galten als Kontrolltiere zu den übrigen Versuchsgruppen.

Die Körpergewichte der 11 weiteren Tiere (Gruppe II) variierten kontinuierlich zwischen 150 und 360 g. An dieser Versuchsgruppe wurde die Abhängigkeit des Ascorbinsäuregehaltes in der NN vom Alter bzw. Körpergewicht demonstriert.

Gruppe III und IV bestand aus 12 Ratten, denen bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 100 g die Schilddrüsen exstirpiert wurden. 7 Tiere wurden 10 Tage p.op. (Gruppe III) und 5 Tiere wurden 18 Tage p.op. (Gruppe IV) getötet. Die Operation wurde nach den Angaben von F a r r i s und G r i f f i t h (22) unter Äthernarkose ausgeführt. Da durch die anatomische Gegebenheit gleichzeitig auch die Parathyreoidea mitentfernt wurde, mußte der Calciumstoffwechsel durch 1 % Ca-Laktat im Trinkwasser unterstützt werden (50). Als Futter wurde normale Zuchtkost ad libidum gereicht.

Als Kontrolle für den tatsächlichen Erfolg der Operation wurde eine genaue Autopsie nach der Tötung vorgenommen. Die Operationstellen waren stets gut vernarbt und in keinem Fall konnte makroskopisch noch Schilddrüsengewebe festgestellt werden.

Gruppe V umfaßte 12 Tiere, die mit einem durchschnittlichen Gewicht von 45 g auf Vitamin A-Mangeldiät gesetzt wurden. Es wurden junge, noch wachsende Ratten genommen, da bei diesen Tieren infolge eines größeren Vitaminbedarfs die Vitamin A-Speicher des Körpers, besonders der Leber bedeutend schneller geleert werden.

Die Vitamin A-Mangeldiät wurde nach der Vorschrift von Osborne und Mendel (68) zusammengestellt. Jedoch wurde der Fettanteil zu Gunsten des Stärkeanteils auf 10% verringert, um die hohe Sterblichkeit der Versuchstiere einzudämmen. Bei der Jugend der Tiere kam es trotzdem durch die schwere Kostform bei 20 % der Tiere zu Verdauungsstörungen, blutigen Durchfällen und Exitus.

Das Futter hatte folgende Zusammensetzung:

Mineralstoffe	4%
Casein	18%
Kartoffelstärke	64%
Fett	10%
Biertrockenhefe	4%

Zur Deckung des Mineralstoffbedarfs enthielt die Mangelkost ein Salzgemisch folgender Zusammensetzung:

Natriumchlorid	(NaCl)	0,173 g
Magnesiumsulfat	(MgSO ₄ , wasserfrei)	0,266 g
Mononatriumphosphat	(NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O)	0,347 g
Dikaliumphosphat	(K ₂ HPO ₄)	0,954 g
Monokalziumphosphat	(CaH ₂ (PO ₄) ₂ + H ₂ O)	0,540 g
Calciumlactat	(Ca(C ₃ H ₅ O ₃) ₂ + 5H ₂ O)	1,300 g
Eisenlactat (Merck)		1,113 g

Ergänzt wird dieses Salzgemisch durch Zugabe von Kaliumjodid und Magnesiumsulfat in Spuren.

Als Casein wurde das handelsübliche "technische Casein" verwendet. Um eventuell vorhandene Vitamin A-Reste zu zerstören, wurde es 5 mal mit Methanol extrahiert, gut mit Wasser ausgewaschen und im Frischlufttrockenschrank mindestens 24 Stunden getrocknet.

Als Kohlehydrat wurde Kartoffelstärke genommen, die ohne Extraktion in Vitamin A-Mangelversuchen verwendet werden kann.

An Stelle des üblichen Palmins wurde Schweineschmalz als Fettanteil gegeben. Der Vitamin A-Gehalt wurde durch 24stündiges Durchlüften bei 100° C bis 120° C zerstört.

Da diese Diät keinerlei Vitamine enthält, müssen die Versuchstiere mit den von ihnen benötigten anderen Vitaminen versorgt werden. Als Träger der Vitamine der B-Gruppe wurde Biertrockenhefe verwendet, die vorher 3 Stunden im Soxhlet mit Aether extrahiert wurde, um das Vitamin A zu entfernen. Vitamin D wurde als Vigantol mit Olivenöl verdünnt und mit dem Futter vermischt. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Vitamins D im Futter zu erreichen, wurde es mit dem gerade noch flüssigen Fett gründlich vermischt, und zwar wurden auf 100 g Schweineschmalz 2 860 i.E. Vitamin D gegeben. Wenn eine Futteraufnahme von 7 g pro Ratte und Tag zugrunde gelegt wird, was eigenen, orientierenden Versuchen entspricht, so wurden den Tieren täglich 20 i.E. Vitamin D zugeführt.

Die trockenen Bestandteile des Futters wurden zunächst in einem großen Gefäß vermengt. Dann wurde das Fett in geschmolzenem Zustand hinzugefügt und das Gemisch gut durchgeknetet. Dieses Futter wurde im Überschuß gegeben und täglich ergänzt, so daß eine Aufnahme ad libidum gewährleistet war. Als Flüssigkeit wurde täglich frisches Leitungswasser gereicht.

Um zu verhindern, daß die Tiere mit dem Einstreumaterial und mit ihrem eigenen Kot Vitamin A aufnehmen, wurden sie in den Glaskäfigen auf Drahtgitter gesetzt, unter die, für die Tiere nicht erreichbar, Sägmehl eingestreut war. Erst nachdem sich die Tiere an die neue Umgebung gewöhnt hatten, wurde mit der Verfütterung der Diätkost begonnen.

Im Verlauf der Vitamin A-Mangelperiode werden die Vitaminreserven des Körpers allmählich aufgebraucht. Dieser Zustand ist bei Wachstumsstillstand erreicht und tritt ungefähr 24-28 Tage nach Beginn der Diät ein. Xerophthalmie konnte nur bei 2 Tieren sicher diagnostiziert werden. Alle Tiere zeigten jedoch ein struppiges Haarkleid und machten einen müden und trügen Eindruck.

Gruppe VI umfaßte 15 Tiere, denen ebenfalls, wie den Tieren der Gruppe V, mit 40-50 g Körpergewicht die Vitamin A-Mangeldiät verabreicht wurde, aber zusätzlich an jedem 2. Tag 0,01 ml (= 400 I.E.) Vitamin A, als Vogan in Olivenöl verdünnt, einpipettiert wurde. Die orale Applikation hat den Vorteil, daß die Ratten wirklich die gewünschte Dosis bekommen. Nach

Brown und Sturtevant (10) ist es auch möglich, Vitamin A einmal in der Woche im Futter zu verabreichen.

Präparation der NN

Sofort nach der Dekapitation der Tiere wurden die NN entnommen und auf einem Objektträger sehr sorgfältig bis zur Kapsel von dem umgebenden Gewebe befreit. Auf einer Mikrowaage wurden die Drüsen dann einzeln gewogen und anschließend sofort in die vorbereiteten Zentrifugengläser mit Trichlor-essigsäure gelegt. Gleichzeitig wurde für eine sehr kurze Dauer der Manipulation Sorge getragen, um durch Verdunstung entstehende Fehler auszuschalten. Für die Ascorbinsäurebestimmung allein ist diese Sorgfalt der Präparation nicht erforderlich. Nach eigenen Versuchen ergaben 40 mg NN umgebenes Gewebe noch so geringe Farbbintensität, daß diese außerhalb des Meßbereiches lagen.

2. Ergebnisse der Tierversuche.

Um an Hand der Ascorbinsäure ein Bild zu bekommen von der momentanen Intensität der NN-Rindenaktivität, ist es notwendig, den absoluten Ascorbinsäuregehalt nicht nur allein für sich zu betrachten, sondern auch ihn in Beziehung zu bringen zu der NN-Größe und diese wiederum zum Körpergewicht und Alter des Tieres. Es wurde daher in den folgenden Tabellen das Körpergewicht, die Summe der beiden NN-Gewichte, das Verhältnis beider Werte zueinander bezogen auf 1 mg NN-Gewebe, die Summe des absoluten Ascorbinsäuregehaltes beider NN und die Ascorbinsäurekonzentration bezogen auf 100 mg NN-Gewebe angegeben.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Gruppe I zusammengestellt. Die mittlere Abweichung ist, wie in allen folgenden Tabellen, nach der Formel

$$M \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n(n-1)}} \text{ berechnet worden.}$$

Tabelle 12

Die Ascorbinsäuregehalte der NN gesunder, normalgefütterter Ratten mit durchschnittlich 92 g Körpergewicht

Körper- gewicht in g	NN-Gewichte in mg	Absoluter Ascorbinsäure- gehalt in μ	Ascorbinsäure- Konzentration in mg%	NN-Gewicht in mg; Körper- gewicht in g
70	19,0	85	445	1:3,7
78	20,5	93	461	1:3,8
80	18,9	86	453	1:4,2
85	20,2	89	438	1:4,1
89	22,3	104	502	1:4,0
90	17,5	82	483	1:5,3
90	20,9	98	446	1:4,3
90	20,3	103	481	1:4,4
90	21,8	91	426	1:4,1
95	21,7	99	455	1:4,4
120	31,6	129	409	1:3,9
127	30,9	140	453	1:4,1
Mittelwerte mit mittlerer statistischer Abweichung:				
92	22,1 $\pm$ 1,3	100 $\pm$ 5,1	454 $\pm$ 7	1:4,2 $\pm$ 0,1

Tabelle 13

Ascorbinsäuregehalte der NN gesunden, normalgefütterter Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 155 g und 362 g

Körper- gewicht in g	NN-Gewichte in mg	Absoluter Ascorbinsäure- gehalt in μ	Ascorbinsäure- Konzentration in mg%	NN-Gewicht in mg:Körper- gewicht in g
155	37,4	144	510	1:4,1
166	23,9	118	494	1:6,9
200	26,3	99	377	1:7,6
202	21,6	91	420	1:9,3
210	47,1	210	447	1:4,5
218	38,0	170	446	1:5,7
245	26,0	112	431	1:9,4
248	31,0	134	435	1:8,0
285	28,9	152	525	1:9,5
332	41,6	160	384	1:8,1
362	36,6	160	436	1:9,6

Die Werte der Tabelle 12 stammen von einer gesunden Population zwischen 70 und 120 g Körpergewicht. Tabelle 13 zeigt Untersuchungen an ebenfalls intakten, aber schwereren und älteren Ratten. Der Quotient NN-Gewicht (in mg) zu Körpergewicht (in g) steigt mit dem Gewicht der Tiere mehr und mehr an. Von 1:4,2 bei 92 g Körpergewicht erhöht er sich auf 1:8,9 bei ca. 300 g Körpergewicht. Die Ascorbinsäurekonzentration zeigt bei Gewichtsanstieg eine sinkende Tendenz.

In Tabelle 14 wurden von diesem gesamten, intakten Tiermaterial die Differenzen der Gewichte und Ascorbinsäuregehalte zwischen der linken und rechten NN der einzelnen Tiere herausgestellt.

Tabelle 14

Unterschiede zwischen den Gewichten und Ascorbinsäuregehalten der linken und rechten NN gesunder, normalgefütterter Ratten

Körper- gewichte in g	NN-Gewichte in mg			Ascorbinsäurekonzentration in mg%		
	links	rechts	D	links	rechts	D
70	10,0	9,0	-1,0	447	442	- 5
78	10,9	9,6	-1,3	457	465	+ 8
80	9,9	9,0	-0,9	464	443	-21
85	10,4	9,8	-0,6	440	436	- 4
89	11,0	11,2	+0,3	505	499	- 6
90	8,8	8,2	-0,6	487	479	- 8
90	10,2	10,7	+0,5	446	446	0
90	10,3	10,0	-0,3	482	480	- 2
90	11,2	10,6	-0,6	419	436	+17
95	11,0	10,0	-0,3	457	452	- 5
120	17,4	14,2	-3,2	418	400	-18
127	15,3	15,6	+0,3	452	455	+ 3
155	20,2	17,2	-3,0	489	530	+41
166	11,9	12,0	+0,1	488	501	+13
200	14,1	12,2	-1,9	374	381	+ 7
202	11,7	9,9	-1,8	415	424	+ 9
210	23,9	23,2	-0,7	447	447	0
218	19,8	18,2	-1,6	447	446	- 1
245	11,9	14,9	+3,0	444	419	-25
285	14,6	14,3	-0,3	520	531	+11
332	31,9	29,7	-2,2	386	382	- 4
362	19,8	16,8	-3,0	450	421	-29
Durchschnittl. Differenz:			-0,9			
			D = 6,3%			
						- 1

Tabelle 15

Gewichte und Ascorbinsäuregehalte der NN von Ratten ca. 11 Tage nach Exstirpation der Schilddrüse

Tage	Körper- p.op. gewicht in g	NN- Gewicht in mg	Absoluter Ascorbinsäure- gehalt in μ	Ascorbinsäure- Konzentration in mg%	NN-Gewicht in mg:Körper- gewicht in g
10	110	21,0	83	389	1:5,2
10	76	18,8	85	452	1:4,0
11	80	20,9	87	397	1:3,8
11	68	20,2	60	298	1:3,3
11	106	20,1	86	430	1:5,2
12	97	16,1	64	395	1:6,0
12	88	18,3	79	429	1:4,8

Mittelwerte mit mittlerer statistischer Abweichung:

89	19,3 $\pm$ 0,6	78 $\pm$ 4,2	399 $\pm$ 19	1:4,6
----	----------------	--------------	--------------	-------

Abweichung der Ergebnisse von intakten Tieren (Gruppe I, Tab. 12):

	D = -13%	D = -22%	D = -12%
t-Test:	t = 1,3	t = 3,3	t = 2,2
	p $\geq$ 5%	p < 0,10%	p = 4,3 %

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse von Ratten 11 Tage nach Exstirpation der Thyreoidea. Die NN-Gewichte zeigen keinen signifikanten Unterschied gegenüber gleichschweren gesunden Tieren (Gruppe I), jedoch scheint eine Tendenz zur Atrophie vorhanden zu sein, was sich auch in dem höheren Quotienten NN-Gewicht zu Körpergewicht ausdrückt. Diese Tendenz läßt sich weiter verfolgen und wird noch deutlicher bei den Tieren, die erst 18 Tage p.op. getötet wurden (Tabelle 16). Das Verhältnis von NN-Gewicht (in mg) zu Körpergewicht (in g) verschiebt sich immer mehr zu Ungunsten der NN. Anstelle 1:4,2 bei Normaltieren wird der Quotient bei thyreoidektomierten Tieren im extremen Fall 1:6,3, im Gesamtdurchschnitt 1:4,9.

Tabelle 16

Gewichte und Ascorbinsäuregehalte der NN von Ratten ca. 18 Tage nach Exstirpation der Schilddrüse

Tage p.op.	Körpergewicht in g	NN-Gewicht in mg	Absoluter Ascorbinsäuregehalt in μ	Ascorbinsäure-Konzentration in mg%	NN-Gewicht in mg:Körpergewicht in g
16	110	17,4	84	483	1:6,3
16	94	15,2	64	421	1:6,2
18	105	22,2	101	514	1:4,8
18	82	19,8	104	525	1:4,3
20	95	20,8	114	538	1:4,6

Mittelwerte mit mittlerer statistischer Abweichung:

97	19,1 $\pm$ 1,2	93 $\pm$ 8,8	496 $\pm$ 21	1:5,2
----	----------------	--------------	--------------	-------

Abweichung von den Ergebnissen 11 Tage p.op. (Tabelle 15):

	D = +1%	D = +18%	D = +24%
t-Test	t = 0,15	t = 1,5	t = 2,4
	p > 5%	p > 5%	p = 0,58%

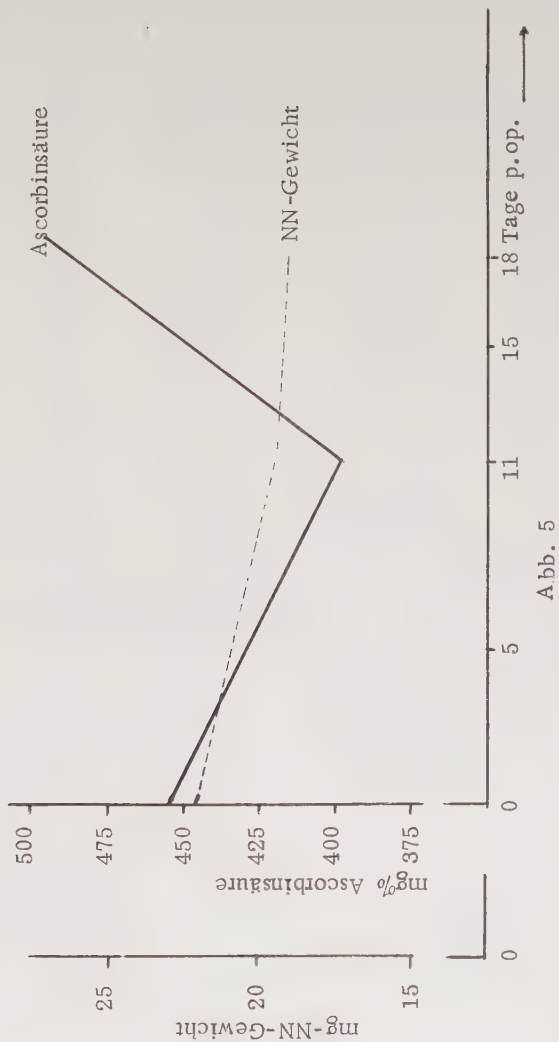


Abb. 5
Gewichte und Ascorbinsäuregehalte der NN von Ratten 11 und 18 Tage nach Exstirpation der Schilddrüse

Tabelle 17

Gewichte und Ascorbinsäuregehalte der NN von Vitamin A-Mangel-Ratten

Körpergewicht in g	NN-Gewicht in mg	Absoluter Ascorbinsäure- gehalt in μ	Ascorbinsäure- Konzentration in mg%	NN-Gewicht in mg:Körper- gewicht in g
49	14,9	96	642	1:3,3
64	21,3	110	513	1:3,0
68	20,6	122	598	1:3,3
68	17,4	108	622	1:3,9
70	21,6	106	489	1:3,2
75	15,5	103	662	1:4,8
80	17,8	120	687	1:4,5
83	20,1	139	692	1:4,1
84	22,6	119	524	1:3,8
95	18,1	116	642	1:5,2
107	22,8	131	578	1:4,7

Mittelwerte und mittlere statistische Abweichung:

77	$19,3 \pm 2,6$	$115 \pm 3,7$	604 ± 21	1:4,0
----	----------------	---------------	--------------	-------

Abweichung von den Ergebnissen normalgefütterter Tiere (Tab. 12):

	D = -13%	D = +15%	D = +33%
t-Test:	t = 0,97	t = 2,4	t = 6,8
	p > 5%	p = 2,5%	p < 0,10%

Abweichung von den Ergebnissen der Vitamin A-Zusatztiere (Tab. 18):

	D = -16%	D = +0	D = +15%
t-Test:	t = 1,1	t = $\bar{0}$	t = 3,7
	p > 5%	p > 5%	p < 0,10%

Die Ascorbinsäurekonzentration ist bei Gruppe III gegenüber den Normaltieren signifikant gesunken (nach dem t-Test, M u d r a (100), sind die Ergebnisse noch gesichert, $p=4,3\%$). 18 Tage p.op. (Gruppe IV) steigt die Ascorbinsäurekonzentration in den NN wieder signifikant an ($p = 0,58\%$ gegenüber Gruppe III) und steigt sogar über die Werte der Normaltiere. Siehe Abb. 5.

Tabelle 18

Gewichte und Ascorbinsäuregehalte der NN von Ratten, die mit Vitamin A-Mangeldiät + Vitamin A-Zusatz gefüttert wurden.

Körpergewicht in g	NN-Gewicht in mg	Absoluter Ascorbinsäure- gehalt in <i>mg</i>	Ascorbinsäure- Konzentration in mg%	NN-Gewicht in mg:Körper- gewicht in g
45	19,6	92	470	1:2,3
72	19,7	94	477	1:3,6
72	23,6	114	476	1:3,0
81	14,7	78	553	1:5,5
87	28,6	164	576	1:3,0
90	23,6	115	486	1:3,8
90	25,1	104	415	1:3,6
93	18,1	96	529	1:5,1
93	30,8	184	591	1:3,0
96	20,7	100	481	1:4,6
102	19,0	103	541	1:5,4
103	21,3	109	512	1:4,8
104	20,8	117	562	1:5,0
118	19,8	102	513	1:6,0
130	30,0	157	523	1:4,3

Mittelwerte mit mittlerer statistischer Abweichung:

92	22,4 $\pm$ 1,1	115 $\pm$ 7,6	514 $\pm$ 12	1:4,2
----	----------------	---------------	--------------	-------

Abweichung von den Ergebnissen normalgefütterter Tiere (Tab. 12):

	D = +1%	D = +15%	D = +13%
t-Test:	t = 0,2	t = 1,6	t = 4,4
	p > 5%	p > 5%	p < 0,10%

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Vitamin A-Mangelratten (Gruppe V) zusammengestellt. Bei allen Tieren, von einer Ausnahme abgesehen, ist Gewichtskonstanz eingetreten. Die NN-Gewichte zeigen wegen den Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Vitamin A-Zusatztieren oder den normalgefütterten Tieren, obwohl die Durchschnittsgewichte gegenüber beiden Vergleichsgruppen um ca. 3 mg niedriger liegen. Der Quotient NN-Gewicht zu Körpergewicht bleibt fast unverändert. Die Ascorbinsäurekonzentration ist gegenüber normalgefütterten Ratten um 1/3 gestiegen. Ihr Anstieg ist also sehr deutlich ($p < 0,01$) (Tabelle 18).

Die Tiere, die Vitamin A-Mangeldiät und zusätzlich reines Vitamin A erhielten, wurden mit einem durchschnittlichen Gewicht von 92 g getötet, um sie mit den gleichschweren Vitamin A-Mangeltieren vergleichen zu können. NN-Gewichte und Quotient NN-Gewicht zu Körpergewicht zeigen keine Divergenz zu den Tieren mit normaler Zuchtkost. Dagegen liegt der Ascorbinsäurespiegel in den NN signifikant höher ($p < 0,01$). Die mittleren Schwankungen innerhalb dieser Gruppe sind zwar etwas größer als die der normalen Vergleichsgruppe, aber ebenfalls relativ gering (Tabelle 18).

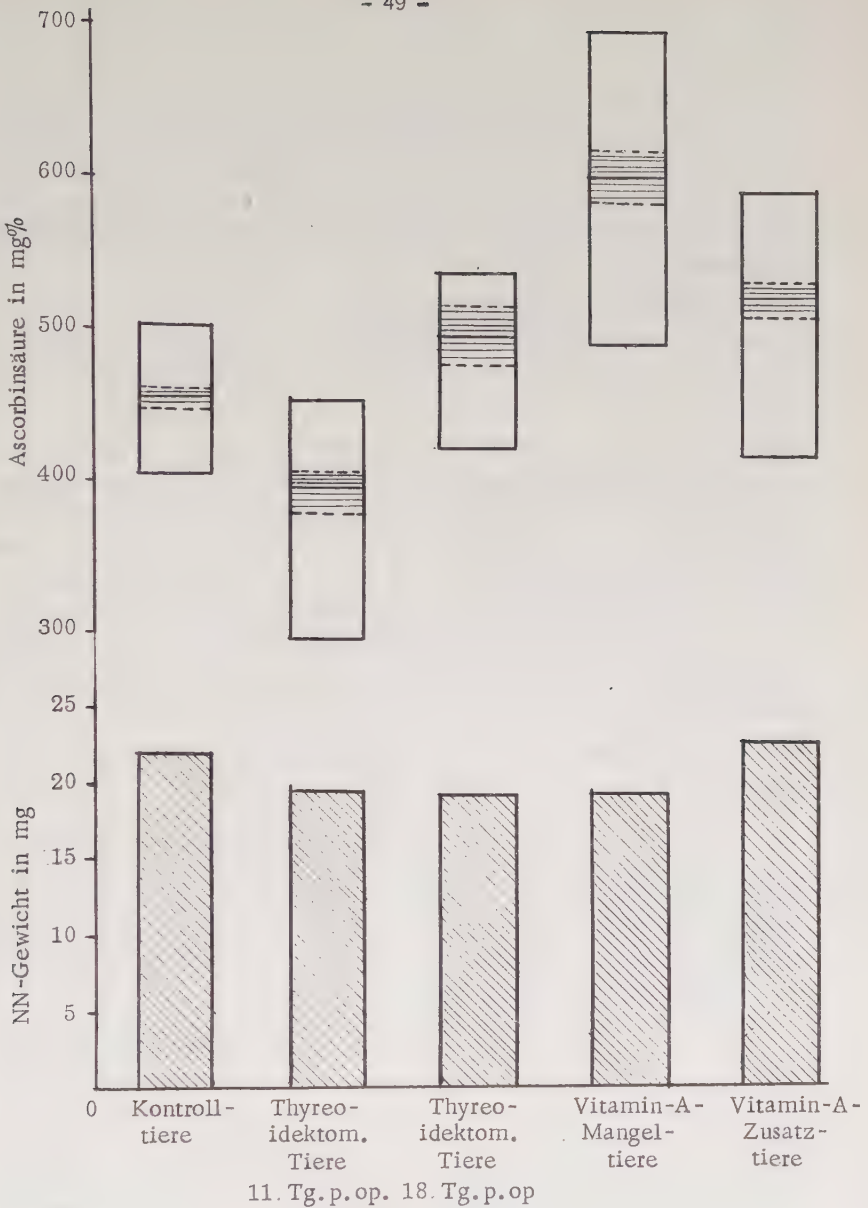


Abb. 6

Graphische Darstellung der NN-Gewichte (schräg schraffierte Säulen) und der Ascorbinsäurekonzentrationen der einzelnen Versuchsgruppen. Die absolute Streuung, der Mittelwert und die mittlere Abweichung vom Mittelwert (quer schraffiert) der Ascorbinsäurekonzentration sind angegeben.

V. Diskussion

1. Besprechung der Versuche zur chemischen Bestimmung der Ascorbinsäure in Nebennieren.

In den vorliegenden Versuchen wurden als Kriterium der NNR-Aktivität die NN-Gewichte und die NN-Ascorbinsäuregehalte von thyreoidektomierten und Vitamin A-Mangelratten gemessen und mit den Normalwerten gesunder Tiere verglichen.

Das NN-Gewicht ist nach T o n u t t i (97) bei Ratten ein Maßstab für die Ausdehnung des funktionsbereiten Drüsengewebes, im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Meerschweinchen. Nach Hypophysektomie ist z.B. bei Ratten eine typische Atrophie der NN mit Gewichtsverlust festzustellen, während bei Meerschweinchen die Atrophie des funktionellen NNR-Gewebes u.U. durch bindegewebige Einlagerungen gewichtsmäßig ausgeglichen werden kann. Innerhalb einer großen, homogenen, gleichaltrigen und intakten Rattenpopulation macht daher die Relation NN-Ascorbinsäure zu NN-Gewicht einen konstanten Quotienten aus.

Die Ascorbinsäure kann in der NN chemisch und auch histologisch bestimmt werden.

Die histologische Methode beruht auf der Fähigkeit der Ascorbinsäure, Silbernitrat zu reduzieren. Sie hat aber den Nachteil, daß eine genaue quantitative Erfassung der Ascorbinsäure nicht möglich ist, die biologisch ebenfalls wirksame Dehydroascorbinsäure nicht erfaßt wird und das Verfahren nicht streng spezifisch ist, da Silbernitrat auch durch andere Stoffe im Protoplasma reduziert werden kann.

Eine gemeinsame Bestimmung der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure ermöglicht das von S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) auf Ratten-NN umgearbeitete chemische Verfahren von R o e und K u e t h e r (70). M a y e r, H a s e l b a c h und B o i s s o n n a s (58) haben dieses etwas langwierige, kolorimetrische Verfahren für Serienbestimmungen vereinfacht und die von R o e und K u e t h e r verwendete Aktivkohle durch Celite 535 ersetzt.

Es konnte jedoch festgestellt werden, daß dieses "Celite"-Verfahren hinsichtlich Adrenalin unspezifisch ist. Das Adrenalin geht mit dem Reagenz

eine meßbare Farbverbindung ein. Das "Kohle"-verfahren wird daher von Adrenalin nicht beeinflusst. Die naheliegende Vermutung, daß es sich dabei um einen unterschiedlichen Adsorptionseffekt von Kohle und Celite gegenüber Adrenalin handelt, hat sich nicht bestätigt, da mit Brom vorbehandeltes Adrenalin auch im Kohleverfahren eine Farbreaktion hervorruft. Die Anwesenheit von Brom erwies sich also als ausschlaggebend für die Reaktion. Wir vermuten deshalb, daß es sich hier vielleicht um einen Oxydationseffekt des Broms an Adrenalin unter vorübergehender Bindung von mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reaktionsfähiger Carbonylgruppe handelt.

Die mit dem Verfahren von M a y e r, H a s e l b a c h und B o i s s o n n a s erhaltenen durchschnittlichen Ascorbinsäurenormalwerte ($568 \mu/100$ mg NN) liegen durch den Einfluß des Adrenalins um rund 20 % über den in der Literatur angegebenen Normalwerten ($463 \mu/100$ mg NN nach F r e e d m a n und G o r d o n (25); $470 \mu/100$ mg NN nach S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78)). Dagegen erhielten wir mit dem von uns modifizierten "Kohle"-Verfahren Ergebnisse, die mit den Angaben in der Literatur weitgehend übereinstimmen (Tabelle 1 u. 12).

Noch deutlicher manifestierte sich der Einfluß des Adrenalins auf das "Celite"-Verfahren bei getrennten Untersuchungen von Mark- und Rindensubstanz von Schweine- und Rinder-NN. Die im NNM mit dem "Celite"-Verfahren gemessenen Ascorbinsäurewerte waren um das 5 fache zu hoch, während mit dem modifizierten "Kohle"-Verfahren die Angaben von G i r o u d (31) bestätigt werden konnten (Tabelle 2).

Die Feststellung, daß Adrenalin auch ohne Erhitzen mit Dinitrophenylhydrazin eine Farbverbindung eingeht, während Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure sich erst nach dem Erhitzen mit dem Reagenz verbinden, ermöglichte es, auf der Basis des "Celite"-Verfahrens eine Methode auszuarbeiten, die eine gleichzeitige Bestimmung von Adrenalin und Vitamin C in NN von Ratten erlaubt.

Für die Praxis der ACTH-Versuche - und das ist der häufigste Anwendungsgrund der Ascorbinsäurebestimmung in der NN - ist eine solche Differenzierung wohl kaum erforderlich. Bei hinreichender Versuchstierzahl wird der ACTH-Effekt ebenso gut erfaßt werden können, ob nun die Wirkung auf Ascorbinsäure allein als Kriterium dient, oder ob bewußt oder unbewußt das Verhalten des Adrenalins miteinbezogen wird. Wenn auch bei Ratten-NN das Adrenalin den kleineren Gewichtsanteil der beiden Wirkstoffe aus-

macht, die nach dem ursprünglichen "Celite"-Verfahren erfaßt werden, so ist es aber doch richtiger, diese gewonnenen Werte nicht ausschließlich als Vitamin C zu interpretieren. Für einzelne, spezielle Versuche und zum Vergleich mit den mit anderen Bestimmungsverfahren erhaltenen Ergebnissen ist es sogar unerlässlich, die beiden Stoffe zu trennen und die Ascorbinsäure rein zu bestimmen.

Das langwierige "Kohle"-Verfahren nach R o e und K u e t h e r wurde vereinfacht und verkürzt. Die Fehlermöglichkeiten beim Einsatz der Kohle wurden untersucht. Als die günstigste Kohleart erwies sich Aktivkohle p.a. (Tabelle 8). Da die zugesetzte Kohlenmenge die Ergebnisse beeinflusst, ist eine genaue Einwaage von 0,3 g bzw. 0,5 g erforderlich (Tabelle 9). Die Benützung eines geeichten Löffels genügt nicht. Die Einwirkungszeit der Kohle muß auf 3 - 4 Minuten beschränkt bleiben (Tabelle 10).

2. Besprechung der Ergebnisse der Tierversuche.

Wie schon erwähnt, haben die NN einer homogenen Rattenpopulation eine ziemlich konstante Ascorbinsäurekonzentration, bezogen auf die Drüsengewichte. Dies konnte durch Versuche an gleichschweren, intakten Ratten bestätigt werden (Tabelle 12). Schon bei der relativ geringen Tieranzahl (12 Tiere) ist die mittlere Abweichung vom Mittelwert sehr gering (454 ± 7). Dies beweist zugleich, daß bei der Tötung der Tiere und Aufarbeitung der NN keine Faktoren auftraten, die die Relation der einzelnen Ergebnisse zueinander wesentlich beeinträchtigt hätten.

Bei erwachsenen Ratten sind die NN im Verhältnis zum Körpergewicht kleiner, als bei jungen, noch wachsenden Tieren (Tabelle 12 und 13). Die NN wachsen also nicht im gleichen Maße wie der Körper, sondern bleiben etwas zurück. Dies stimmt mit der Überlegung überein, daß wachsende Tiere einen höheren Stoffwechsel und daher auch einen größeren Verbrauch an Rindenhormonen pro g Körpergewicht haben.

S a y e r s, S a y e r s und W o o d b u r y (78) wiesen darauf hin, daß die Ascorbinsäurekonzentrationen in den beiden NN desselben Tieres ungefähr gleiche Werte haben. Dies konnte an 22 intakten Ratten bestätigt werden (Tabelle 14). Die absolute Vitamin C-Menge in der NN ist eine Funktion des Gewichtes der Drüse. Je kleiner die NN, desto höher ist der absolute Ascorbinsäurespiegel und umgekehrt. Die beträchtlichen Schwankungen,

die die Gewichte der linken und rechten NN zum Teil aufweisen, treten daher bei der Ascorbinsäurekonzentration, bezogen auf das Drüsengewicht, kaum in Erscheinung. Von 22 unbelasteten, normalen Ratten differierten die Ascorbinsäurekonzentrationen der linken und rechten NN nur in 2 Fällen um mehr als 25%. Die rechten NN waren im Durchschnitt um 6,5% kleiner als die linken.

Nach F r e e d m a n und G o r d o n (25) steigt nach Thyreoidektomie die Ascorbinsäurekonzentration der NN in der 1. Woche p.op. an, um dann allmählich wieder zu sinken und 4 Wochen p.op. sogar unter dem Normalspiegel zu liegen. Die Ergebnisse der eigenen, entsprechenden Versuche stehen zu diesen Mitteilungen in einem gewissen Gegensatz. Am 11. Tag p.op. war die Ascorbinsäurekonzentration um 12% gesunken und lag am 18. Tage p.op. wieder über den Normalwerten (Abb. 5, Tabellen 15 und 16). Abfall und Wiederanstieg sind nach dem t-Test gesichert. Diese Diskrepanz mit den Ergebnissen von F r e e d m a n und G o r d o n erklärt sich vielleicht dadurch, daß die zum Vergleich stehenden Versuche nicht zum gleichen Zeitpunkt p.op. angesetzt wurden. Die NN-Gewichte fallen, analog den Untersuchungen von F r e e d m a n und G o r d o n in der ersten Zeit nach der Exstirpation der Schilddrüse leicht ab und bleiben 14 % unter dem Normalwert auf einer konstanten Höhe. Diese Gewichtsveränderungen sind jedoch nach dem t-Test nicht gesichert.

Nach T o n u t t i (98) führt Thyreoidektomie bei den Ratten zu den gleichen regressiven Veränderungen wie Hypophysektomie. Allerdings zeige die Thyreoidektomie nur die einleitenden Stadien dieses Umbauvorganges. Den Grund zu diesen Veränderungen, die in ähnlicher Weise auch nach der Kastration auftreten, sieht T o n u t t i darin, daß bei der so engen Beziehung der einzelnen Zellformen in der Bildungsstätte der glandotropen Hormone eine quantitative Änderung hinsichtlich eines Hormons eine Änderung auch hinsichtlich der beiden anderen glandotropen Hormone nach sich ziehen müßte.

Man könnte sich also vorstellen, daß durch die Operation ein Abfall des Ascorbinsäurespiegels bewirkt wird und dass die bei intakten Ratten an einen Stress sich anschließende, vorübergehend vermehrte Biosynthese der Rindensteroiden durch den Mangel an corticotropem Hormon ausbleibt. Der darauf folgende erneute Anstieg der Ascorbinsäure ist vermutlich eine Art Speichervorgang des ruhenden Organs, adaequat den geringeren Stoffwechselsansprüchen dieser Tiere.

Die NN der Vitamin A-Mangeltiere zeigen einen Anstieg der Vitamin C-Gehalte um 33% gegenüber den Normaltieren und um 17% gegenüber den mit Vitamin A-Mangeldiät + Vitamin A-Zusatz gefütterten Tieren. Die Ergebnisse sind beiden Vergleichsgruppen gegenüber sehr gut gesichert ($p < 0,10\%$). Die NN-Gewichte liegen im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen um 13% bzw. 16% niedriger, was nach dem t-Test jedoch nicht gesichert ist (Tabelle 17).

Der Zusammenhang zwischen dem Vitamin A-Haushalt des Organismus ist noch nicht geklärt. Daher ist eine Interpretation dieser Ergebnisse nicht möglich. Es wird vermutet, daß durch das Fehlen des Vitamins A eine Hyperthyreose entsteht, die eine vermehrte NNR-Aktivität zur Folge hat.

Die Ascorbinsäurekonzentrationen der Vitamin A-Zusatztiere liegen 13 % über den Normalwerten ($p < 0,10\%$). Die NN-Gewichte sind nicht verändert (Tabelle 18). Da diesen Tieren die wichtigsten Vitamine in physiologischen Dosen zusätzlich verabreicht wurden, ist die vermehrte NNR-Aktivität auf die unnatürliche, synthetische Diätkost zurückzuführen, die anscheinend eine außerordentliche Belastung für den Organismus darstellt.

VI. Zusammenfassung

1. Die Spezifität des Ascorbinsäurebestimmungsverfahrens in der NN nach Mayer, Haselbach und Boissonnas (58) wurde untersucht. Die Untersuchungen zeigten, daß mit diesem Verfahren außer Ascorbinsäure auch Adrenalin mitbestimmt wird.
2. Es wurde ein einfaches Verfahren entwickelt, das es erlaubt, in demselben Gewebe gleichzeitig Vitamin C und Adrenalin zu bestimmen.
3. Das Ascorbinsäurebestimmungsverfahren nach Roe und Kuethe (70) wurde vereinfacht. Die Erhitzungsdauer wurde von 3 Stunden auf 5 Minuten gekürzt, die Erhitzungshöhe von 35°C auf 100°C gesteigert.
4. Die Fehlermöglichkeiten dieses Verfahrens beim Einsatz der Aktivkohle wurden überprüft. Die Untersuchungen erstreckten sich auf Kohleart, Kohlemenge und Einwirkungszeit der Kohle.
5. Mit dem verkürzten Verfahren nach Roe und Kuethe wurde der Ascorbinsäuregehalt verschieden vorbehandelter Ratten gemessen.
6. Der Quotient NN-Gewicht zu Körpergewicht steigt bei intakten, wachsenden Ratten mit zunehmendem Alter beständig an.
7. Die rechte NN ist in fast allen Fällen - im Durchschnitt um 6,5 % - kleiner als die linke. Die Ascorbinsäurekonzentrationen beider NN differieren dagegen nur sehr gering.
8. Nach Thyreoidektomie liegt der Ascorbinsäurespiegel der NN am 10. Tage p. op. signifikant unter den Normalwerten und am 18. Tage p. op. knapp über den Normalwerten gleichschwerer und unbelasteter Ratten. Die absoluten Schwankungen der Ergebnisse sind im Verhältnis zu den intakten Tiere relativ groß.
9. Bei jungen Tieren, die bis zum Wachstumsstillstand mit einer Vitamin A-Mangeldiät gefüttert wurden, stieg der Ascorbinsäuregehalt der NN signifikant über den Normalwert.
10. Wachsende Ratten, die zu der Vitamin A-Mangeldiät Zusätze von reinem Vitamin A erhielten, zeigten einen Ascorbinsäurespiegel, der zwischen

den Werten der gesunden und den der Vitamin A-Mangelratten lag.

VII. Literaturverzeichnis

1. Abderhalden, E.: Fermentforsch., 14, 367 (1934).
2. Abderhalden, R.: Dtsch.med.Wschr., 74, 1429 (1949).
3. Amano, N.: Arch.klin. Chir., 182, 392 (1935).
4. Baumann, E.J., Marine, D.: Endocrinology, 36, 400 (1944).
5. Biedl, A.: Innere Sekretion, 2. Aufl.,
1, 313 (1913).
6. Bloch, K.J.: J.Biol.Chem., 157, 601 (1945).
7. Borsook, Davenport,
Jeffreys, Warner: J.Biol.Chem., 117, 237 (1937).
8. Bowman, D.E., Muntwyler, E.: Proc.Soc.Expl.Biol.Med., 35, 557
(1937).
9. Brodin, S.E.: Acta Anat., Suppl. 3, (1945).
10. Brown, R.P., Sturtevant, M.: Vitamins and Hormones, 7, 173 (1949).
11. Cheng, C.D., Sayers, G.,
Goodman, C.S., Swinyard, H.: Am.J. Physiol., 158, 45 (1949).
12. Chester, J.: Endocrinology, 45, 514 (1949).
13. Clara, M.: Vitamine und Hormone, 6, 12 (1955).
14. Cohen, R.S.: Am.J.Anat., 56, 143 (1935).
15. Collip, J.B., Anderson, E.M.,
Thomson, D.L.: Lancet, 225, 347 (1933).
16. Deane, H.W., Greep, R.D.: Endocrinology, 41, 243 (1947).
17. Eisenstein, A.B., Shank, R.E.: Proc.Soc. Exper.Biol.a.Med. 78,
619 (1951).
18. Emery, F.E., Winter, C.A.: Anat. Rec., 60, 381 (1934).
19. Endröczy, F., Mess, B.: Endokrinologie, 53, 1 (1955).
20. Euler, H.j.: Erg. der Physiol., 34, 360 (1932).
21. Evans, H.M.: J.Am.Med.Assoc., 101, 425 (1933).
22. Farris, E.J., Griffith, J.G.: The Rat in Laboratory Investigation,
London 1949.
23. Feldman, J.D.: Anat.Rec., 109, 41 (1951).
24. Fortier, C., Selye, H.: Am. J.Physiol., 159, 433 (1949).
25. Freedman, H.H., Gordon, A.S.: Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med., 75, 729
(1950).
26. Freedman, H.H., Gordon, A.S.: Endocrinology, 56, 135
(1955).
27. Gabrilove, J.L., Soffer, L.: Endocrinology, 47, 464 (1950).

28. Gerlei, F.: Endocrinology, 19, 387 (1937).
29. Ghosh, B.N.: J.Indian.Chem.Soc., 16, 657 (1939).
30. Ghosh, B.N.: J.Indian.Chem.Soc., 16, 241 (1939).
31. Giroud, A.: Erg.d.Vitamin- u.Hormonforsch., 1, 105 (1938).
32. Giroud, A., Leblond, C.P.: "L'Acide ascorbique dans les tissus et sa détection", Paris 1934.
33. Glick, D., Biskind, G.R.: J. Biol.Chem., 110, 1 (1935).
34. De Groot, J., Harris, G.W.: J.Physiol., 111, 335 (1950).
35. Halmi, N.S., Bogdanove, E.M.: Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med., 77, 519 (1951).
36. Hartmann,, F.A., Hartmann, W.E., Deane, G.A.,
Mc Arthur, C.G.: Am.J. Physiol., 86, 353 (1928).
37. Haynes, R., Savard, K., Dorfman, R.I.: Sciences, 116, 190 (1952).
38. Herrick, E.H., Mead, E.R., Egerton, B.W., Hughes, J.: Endocrinology, 50, 259 (1952).
39. Hoen, E., Langefeld, H., Oehme, C.: Endocrinology, 21, 305 (1938).
40. Hofmann, H., Staudinger, H.: Arzneimittelforsch., 1, 416 (1951).
41. Hoskin, R.G.: J.Am.med.Assoc., 55, 1724 (1910).
42. Houssay, B.A., Biasotti, A., Compt.rend.soc.biol., 114, 737, Mazocco, P., Sammartino, R.: (1933).
43. Houssay, B.A., Lewis, J.: Am.J.Physiol., 64, 512 (1923).
44. Huszák, J.: Z.Physiol.Chem., 219, 275 (1933).
45. Karg, H.: Vitamine und Hormone, im Druck.
46. Karg, H.: Hoppe-Seyler's Z., 304, 148 (1956).
47. Kracht, J.: Arch.exper.Path.u.Pharm., 223, 358 (1954).
48. Kuchel, C.C., Mitchell, M.L.: Australian Expt.Biol.a.Med.Sci., 14, 51 (1936).
49. Lauber, H.J., Dunke, H., Patzcke, A.: Z.Ges.exptl.Med., 102, 1 (1937).
50. Leblond, C.P., Earthy, H.: Endocrinology, 51, 27 (1952).
51. Leblond, C.P., Hoff, H.E.: Endocrinology, 35, 229 (1944).
52. Libretti, A., Tusini, G.: Arch.internat.Pharmaco-dynamic, 92, 223 (1952).

53. Li, C.H., Evans, H.M.,
Simpson, M.E.: J.Biol.Chem., 149, 413 (1943).
54. Loeser, S.: Arch.exper.Path., 173, 62 (1933).
55. Long, C.N.H.: Federat.Proc., 6, 461 (1947).
56. Lowe, J.S., Morton, O.A.,
Harrison, R.G.: Nature (London), 172, 716 (1953).
57. Löwenstein, B., Zwemer, R.L.: Endocrinology, 39, 63 (1946).
58. Mayer, K.H., Haselbach, C.H.,
Boissonnas, R.A.: Helv.Chem.Act., 35, 1781 (1952).
59. Mayer, J., Krehl, W.A.: Arch.of Biochem., 16, 313 (1948).
60. Menten, M.C., Smith, M.P.: Am.J.Disease Children, 52, 54 (1936).
61. Mitzkewitsch, M.S.: Arch.exper.Path.u.Pharm., 174, 339
(1934).
62. Mlinko, Z.: Z.Physiol. Chem., 256, 42 (1938).
63. Money, W.L., Fayer, J.,
Lucas, V., Rawson, R.W.: Endocrinology, 51, 87 (1952).
64. Morris, D.M.: Science, 117, 61 (1953).
65. Nigeon-Dureuil, M.,
Ratsimamanga, A.R.: Compt.rend.soc.biol., 148, 47
(1954).
66. Oertel, G., Hein, H.: Hoppe-Seyler's Z., 297, 249 (1954).
67. Ohta, K.: Arb.med.Fak.Okayama, 6, 1 (1938).
68. Osborne, Mendel: J. Biol.Chem., 45, 277 (1921).
69. Mc Queen-Williams, M.: Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 32, 296
(1934).
70. Roe, J., Kuether, C.A.: J.Biol.Chem., 147, 399 (1943).
71. Roe, J., Mills, M.B., Oester-
ling, M.J., Damron, D.: J.Biol.Chem., 174, 201 (1948).
72. Sabalitschka, T.: Vitamine u. Hormone, 4, 376 (1944).
73. Sayers, G., Sayers, M.A.: Rec.Prog.in Horm.Research, 2, 81
(1948).
74. Sayers, G., Sayers, M.A.: Federat.Proc., 5, 200 (1946).
75. Sayers, G., Sayers, M.A.,
Fry, E.G., White, A.,
Long, C.N.H.: Yale J.Biol.Med., 16, 361 (1944).
76. Sayers, G., Sayers, M.A.,
Liang, T.Y., Long, C.N.H.: Endocrinology, 32, 373 (1943).
77. Sayers, G., Sayers, M.A.,
Liang, T.Y., Long, C.N.H.: Endocrinology, 38, 1 (1946).

78. Sayers, M.A., Sayers, G.,
Woodbury, L.A.: Endocrinology, 42, 379 (1948).
79. Sayers, G., White, A.,
Long, C.N.H.: J.Biol.Chem., 149, 425 (1943).
80. Schmid, R., Gonzalo, L.,
Blobel, R., Muschke, E.,
Tonutti, E.: Naturwiss., 43, 424 (1956).
81. Schmidt, H., Staudinger, H.: Biochem.Z., 325, 288 (1954).
82. Schreiber, V.: Endokrinologie, 33, 259 (1956).
83. Schulze, E.: Klin.Wschr., 1120, 1942 II.
84. Schulze, E., Hundhausen, G.: Naunyn-Schmidtberger's Arch. 192, 43 (1939).
85. Selye, H., Horava, A.: 2nd Ann.Report on Stress, 1952, 165.
86. Selye, H., Jensen, H.: Ann.Rev.Biochem., 15, 347 (1946).
87. Smith, P.E.: Anat.Rec., 32, 221 (1926).
88. Smith, P.E., Greenwood, C.F.,
Foster, G.C.: Am.J.Path., 3, 669 (1926).
89. Staudinger, H.: Angew.Chem., 64, 283 (1952).
90. Stepp, Kühnau, Schroeder: Die Vitamine, 1936, S. 13.
91. Stepto, R.C., Pirani, C.L.,
Consolazzio, C.F., Bell, J.: Endocrinology, 49, 755 (1951).
92. Sure, B., Theis, R.M.,
Harolson, R.T.: J.Biol.Chem., 29, 245 (1939).
93. Swingle, W.W.: Am.Naturalist., 41, 132 (1927).
94. Swingle, W.W., Pfiffner, J.J.: Am.J.Physiol., 96, 153 (1931);
96, 164 (1931); 96, 180 (1931).
95. v. Scent-Györgyi, A.: Biochem.J., 22, 1387 (1928).
96. Treppermann, J., Engel, F.L.,
Long, C.N.H.: Endocrinology, 32, 373 (1943).
97. Tonutti, E.: Z.mikro.anat.Forsch., 52, 32 (1942).
98. Tonutti, E.: Endokrinologie, 25, 145 (1943).
99. Torrance, C.C.: J.Biol.Chem., 132, 575 (1940).
100. Mudra: Einführung in die Methodik der Feld-
versuche, Leipzig 1952.
101. Verzár, F.: Schweiz.med.Wschr., 39, 1163 (1943).
102. Verzár, F.: Die Funktion der NNR, 1939.
103. Vogt, M.: J.Physiol., 107, 239 (1948).
104. Wallach, D.P.,
Reineke, E.P.: Endocrinology, 45, 75 (1949).

105. Wheeler, T.D., Vincent, S.: Trans. roy. Soc. canada., 11, 125
(1917).
106. Wislocki, G.B., Crowe, S.J.: Bull. Hopkins, Hosp.Baltim., 35, 187
(1924).
107. Yamamoto, M.: Z.Physiol.Chem., 243, 266 (1934).
108. Zarrow, M.X., Money, W.L.: Endocrinology, 44, 345 (1949).
109. Zarrow, M.X., Zarrow, I.G.: Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 76, 622
(1951).
110. Zwemer, R.L.: Am.J.Physiol., 79, 658 (1927).

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die großzügige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Johannes B r ü g g e m a n n meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Dr. Heinrich K a r g danke ich für die vielen wertvollen Anleitungen und stets gewährten Diskussionen. Ebenfalls bin ich Herrn Dozent Dr. B r o n s c h für seine freundlichen Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 10. 10. 1931 wurde ich, Otto Käppeler, als Sohn des Otto Käppeler, Rektor in Schramberg, und seiner Ehefrau Hilde, geb. Bischofberger, in Schramberg geboren. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule in Schramberg trat ich in die Kepler-Oberschule für Jungen in Ulm/Do. ein. Ab 1945 besuchte ich die Oberschule in Riedlingen/Wttbg., wo ich 1950 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem dreimonatigen Aufbaudienst erhielt ich im Sommersemester 1951 die Zulassung zum Studium der Veterinärmedizin. Im Sommer 1956 bestand ich an der Universität München das Tierärztliche Staatsexamen.

